UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1960-1961 N° 805

LES FERMENTS LIPOLYTIQUES DES MYCOBACTÉRIES

Leurs caractères différentiels par rapport aux lipases pancréatiques et fongiques

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 26 janvier 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

OTTO-GEORG KROEHNE
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
— 1961 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0042

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1960-1961 N° 805

LES FERMENTS LIPOLYTIQUES DES MYCOBACTÉRIES

Leurs caractères différentiels par rapport aux lipases pancréatiques et fongiques

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 26 janvier 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

OTTO-GEORG KROEHNE
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
— 1961 —

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. DUQUÉNOIS, *Doyen*, ✻, I. ✪, ⚙
GAZET DU CHATELIER, *Assesseur*, I. ✪
CLADY, *Secrétaire*, I. ✪

DOYEN HONORAIRE :

M. VOLMAR O. ✻, C. ✪

PROFESSEURS :

MM.	LAPP, ✻, I. ✪	Physique
	SARTORY, ✻, I. ✪, O. ⚙	Bactériologie
	CORDIER, ✻, I. ✪	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ✻, I. ✪, ⚙	Matière médicale
	JAEGER, I. ✪, ⚙	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I. ✪	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	EBEL, ✻, ⚙ I. ✪	Chimie biologique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ⚙, ✪	Sciences naturelles
	MÉTAIS (chargé des fonctions)	Sciences appliquées
	N.	Sciences naturelles
	N.	Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :

M. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie analyt. et séméiolog.
	LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techn.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	C. MEYER	Comptabilité et fiscalité pharmaceutiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

M.	MALGRAS	Bactériologie
Mme	KRISTENSEN	Chimie pharmaceutique
MM.	LAUSTRIAT	Chimie et Physique
	MATHIS (chargés des fonctions)	Chimie
	CARBIENER (chargés des fonctions)	Histoire naturelle
	STAHL (chargés des fonctions)	Bactériologie et Parasitologie

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur Ch. LAPP

Professeur de Physique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER

Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A la mémoire de mon Père,

A ma chère Mère,

à qui je dois tout, je dédie ce travail en témoignage de reconnaissance profonde et d'affection filiale.

A tous ceux qui me sont chers.

A tous mes Maîtres de l'Université Libre de Berlin-Ouest.

INTRODUCTION

Il y a très longtemps que les hommes connaissent certaines réactions chimiques dues aux ferments : il suffit de mentionner la fermentation alcoolique pour la préparation du vin et de la bière, connue sous le nom de « *fermentatio* ». SPALANZANI a remarqué en 1783 la fluidification de la viande par le suc gastrique des oiseaux. En 1837, LIEBIG et WŒHLER ont observé la dégradation enzymatique de l'amygdaline par les mucines. A peu près simultanément, le Suédois BERZELIUS a développé sa théorie de l'activité catalytique des ferments, et en 1839, LIEBIG a découvert que *les enzymes sont des corps azotés, se décomposant facilement et qui sont à la base de la décomposition des substrats fermentescibles.*

En 1857, PASTEUR a établi que *les processus de fermentation sont en rapport étroit avec la vitalité des levures* et Gabriel BERTRAND a ensuite démontré que ces phénomènes enzymatiques ne sont pas inhérents uniquement aux cellules vivantes, mais qu'il s'agit de substances chimiques élaborées par des éléments organisés, mais actives sans leur présence.

En 1897, BUCHNER a confirmé cette conception, en montrant qu'un suc de levures dépourvu de toute cellule organisée est capable de produire une fermentation organique; en 1903, BUCHNER et MEISENHEIMER ont obtenu des processus enzymatiques au moyen de microorganismes tués; *il s'agissait de la fermentation lactique et acétique.*

Les travaux d'OSTWALD, datant de 1893, ont définitivement prouvé *l'action catalytique des ferments et la réversibilité de leur activité qui peut être dégradante ou synthétisante.* Puis, en 1900, CASTLE et LŒWENHART ont apporté pour la première fois la preuve de la formation enzymatique du *Butyrate d'éthyle* à partir de l'Acide butyrique et de l'Alcool éthylique traités par la lipase pancréatique.

Ces recherches concernant les ferments lipolytiques ont ensuite fait de rapides progrès et nous ne voudrions citer, à titre documentaire, que les noms de BODENSTEIN et DIETZ, RONA et AMMON, WILLSTÆTTER et MEMMEN, qui tous ont largement contribué à élargir nos connaissances sur la formation et la dégradation des graisses et des lipides.

Pendant fort longtemps, on a utilisé des *méthodes titrimétriques ou stalagmométriques* (viscosimétriques) pour le dosage de ces ferments lipolytiques. Nous ne voudrions pas insister sur *la classification des enzymes en général et des hydrolases en particulier ;* dans ce dernier groupe nous trouvons les *estérases* et les *lipases* qui ont fait l'objet d'études

approfondies ces dernières années dans le *Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.*

Pendant très longtemps on a confondu les *estérases*, agissant principalement sur des substrats lipidiques à molécule simple, avec les *lipases proprement dites* qui attaquent et synthétisent surtout des graisses à acide gras supérieur.

A la suite de ces travaux, effectués par J. Meyer, Schær, Marti et Christen, nous nous sommes vu proposer l'étude des lipases de *Mycobacterium phlei Mœller.* En nous basant sur ces recherches antérieures, nous avons élaboré notre plan de travail.

Avant de commencer l'exposé de notre sujet, nous ne voudrions pas manquer de remercier bien vivement Monsieur R. Sartory, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg ;* il nous a accueilli avec la plus grande amabilité dans son laboratoire et nous fait l'honneur de présider notre jury.

Nous remercions également Monsieur Ch. Lapp, *Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* pour la gentillesse avec laquelle il a accepté de siéger dans ce jury.

Notre reconnaissance la plus vive va à Monsieur J. Meyer, *Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg :* après avoir été l'instigateur de ce travail, il nous a guidé de ses conseils et de ses encouragements, nous permettant de mener à bien la tâche que nous nous étions fixée.

Nous voudrions dire aussi à Monsieur J. Malgras, *Chargé de Cours* à Monsieur Y. Marie et à Mademoiselle M. Brender, Assistants, que nous n'oublions pas qu'ils nous ont aidé chaque fois que cela leur était possible ; notre gratitude leur est acquise avec notre amical souvenir.

PLAN DE TRAVAIL

En nous basant sur les travaux de SCHÆR, MARTI et CHRISTEN, nous avons examiné les lipases de *Mycobacterium phlei Mœller*, puis nous avons comparé leur activité avec celle de *lipases pancréatiques* et d'une *lipase de Candida lipolytica* isolée par ARNOLD-MEYER.

Le dosage de l'activité lipasique a été effectué à l'aide d'un appareillage monté d'après les directives de J. MEYER et MALGRAS *.

Après avoir préparé des cultures de *Mycobacterium phlei* en milieu liquide, nous avons procédé à l'isolement et à la purification des facteurs lipolytiques et préparé une poudre déshydratée stabilisée. C'est avec cette préparation que nous avons fait des essais de solubilité dans différents solvants tels que : *huile d'olive*, *glycérine*, *eau*.

On a ensuite essayé d'obtenir une lipase plus active et plus soluble en traitant les corps bactériens dans un broyeur cylindrique fermé, mobile autour de son axe, muni de sable de quartz et de galets en porcelaine de plusieurs tailles.

Puis nous avons tenté de préparer des lipases hydrosolubles en traitant *des suspensions aqueuses de Mycobacterium phlei au moyen de Papaïne*. Des essais ont été réalisés dans le but d'obtenir des lipases solubles en faisant appel à différentes solutions tampon, puis pour libérer la lipase phléique par un traitement aux solutions normales de HCl et de NaOH normales, à la température de 50°.

Dans le chapitre II nous contrôlons l'hydrolyse d'un *phospholipide* par des Zoolipases, des Phytolipases fongiques et des Bactériolipases. Dans une *expérience témoin, nous utilisons l'huile d'olive* comme substrat réactionnel spécifique. Nous décrivons ensuite nos essais d'hydrolyse *de Phosphatide de soja, de Cholinephospholipide, de Colaminephosphatide et d'Inositophosphatide*. Ces expériences sont complétées par l'étude de l'hydrolyse de la Lécithine au moyen des différentes enzymes et en ajustant les substrats réactionnels à pH = 8,0 - 8,2 et 7,0 - 7,2.

Nous faisons ensuite une étude différentielle de l'action de nos lipases sur *le jaune d'œuf et la lécithine*, puis nous essayons de caractériser *notre lipase mycobactérienne* par ses propriétés hydrolytiques vis-à-vis du jaune d'œuf que nous utilisons à des concentrations variables. Ces essais sont faits à titre comparatif au moyen *de lipase de Mycobacterium phlei, de lipase pancréatique et d'une toxine de Staphylocoque* n° 2185 à pouvoir lécithinasique établi par RICHOU.

* Maison ELECTRONA, Strasbourg-Lingolsheim.

Dans le chapitre suivant, nous effectuons des dosages comparatifs de l'hydrolyse *des Tweens* 20, 60 et 80.

Nous traitons ensuite une *poudre de Mycobacterium phlei par l'alcool absolu, l'éther et le toluène*, d'après une méthode indiquée par CALMETTE, pour débarrasser les corps bactériens autant que possible de leur gaine ciro-graisseuse. Les bactéries ainsi traitées, de même que les substances ciro-graisseuses séparées, seront examinées quant à leur activité lipasique.

Dans le dernier chapitre, nous exposons nos recherches expérimentales sur les animaux. Traités par des injections successives de *suspension lipasique*, les lapins devraient élaborer *des Antilipases* que nous essayerons de mettre en évidence. Ces expériences sont effectuées au moyen de *lipase de Mycobacterium phlei* et de *Candida lipolytica*.

Des *conclusions générales* terminent notre exposé.

CHAPITRE I

CULTURE DE MYCOBACTERIUM PHLEI ET ISOLEMENT DE SA LIPASE

Une grande partie de nos expériences a trait *à l'étude des lipases et estérases de Mycobacterium phlei*. Il s'agit d'un organisme facultativement aérobie, qui est encore connu sous les noms de *Bacillus thimothei Mœller, Grasbacillus Mœller. Mycobacterium mœlleri, Bacille paratuberculeux* n° 93, d'après Hauduroy, et en terme plus générique *Bacille de la thimothée* ou *Bacille de la fléole des prés.*

Morphologiquement, cet organisme se présente en bâtonnets de 1 à 4 μ de long sur 0,2 à 4.0 μ de large, droits ou légèrement incurvés, immobiles. Suivant les conditions culturales, on peut obtenir des formes modifiées, plus ou moins involuées; *Mycobacterium phlei* fait partie des bactéries acido-alcoolo-résistantes et sa coloration se pratique d'après la méthode de Ziehl-Neelsen.

Comme substrat nutritif, nous avons eu recours à un jus de pomme de terre préparé de la façon suivante :

1) Jus de pomme de terre	500 cc
2) Peptone	10,0 g
Glucose	10,0 g
Glycérophosphate de potassium	0,5 g
Sulfate de magnésie	0,25 g
Chlorure de sodium	0,50 g
Extrait de viande Liebig	2,50 g
Citrate de fer ammoniacal	0,05 g
Eau ordinaire q. s. p.	500,0 cc.

3) Glycérine, respectivement 60 ou 120 g, en diminuant d'autant la quantité d'eau.

En ce qui concerne les détails de la préparation de ce milieu, nous renvoyons à J. Meyer (1) et Marti (2). Disons seulement que l'on prépare d'un côté le jus de pomme de terre aqueux, et de l'autre la solution peptonée, glucosée, glycérinée, puis on mélange les deux substrats à parties égales. Pour la culture de *Mycobacterium phlei*, il importe surtout d'ajuster ce substrat au pH optimal de 7,2 à 7,4.

Le milieu de culture ainsi préparé est réparti à raison de 250 cc dans des boîtes de Roux d'un litre; on stérilise à l'autoclave à 115° pendant 30 minutes, on laisse refroidir et on ensemence, avec toutes les précautions d'asepsie, au moyen d'une souche de *Mycobacterium phlei*. Les cultures sont ensuite placées à l'étuve à 37°. Après six jours, nous avons constaté dans toutes les boîtes un développement luxuriant.

Préparation de notre poudre lipasique déshydratée:

Les cultures âgées de six jours sont filtrées à travers une gaze double pour séparer le substrat aqueux de la masse bactérienne. Marti a déjà pu démontrer que *le milieu aqueux des cultures de Mycobacterium phlei est dépourvu d'estérase et de lipase*. Nous pouvons confirmer ces résultats.

Le résidu bactérien récolté sur le filtre de gaze a été lavé au moyen d'eau distillée, puis nous le partageons en deux fractions, dont la première est fortement centrifugée pour séparer autant que possible le reste des eaux de lavage de la masse bactérienne ; on décante soigneusement et le résidu bactérien est desséché dans le vide sous anhydride phosphorique jusqu'à poids constant. La masse déshydratée ainsi obtenue est soigneusement triturée dans un mortier en porcelaine, pour obtenir une poudre fine, légèrement jaunâtre avec laquelle nous avons effectué nos recherches.

L'autre fraction a été employée pour réaliser éventuellement sa purification par des solvants organiques.

Essai de purification au moyen d'acétone et d'éther:

Nous avons traité cette fraction du résidu mycélien au moyen de quatre fois son poids d'Acétone refroidi à 10°. Le tout a été agité pendant 30 minutes, puis disposé pendant 12 heures à la glacière. Après ce temps, l'Acétone a été évaporé par distillation dans le vide à une température constante de 50°. Le résidu ainsi obtenu a été repris dans l'eau et aux examens de contrôle, *nous n'avons plus décelé de lipase.*

La masse bactérienne humide qui restait après la distillation sous vide, est lavée à trois reprises au moyen *d'un mélange acétone-éther* à parties égales, puis séchée à l'étuve à 37°. La masse bactérienne finement broyée pour obtenir une poudre blanche, *s'est avérée dépourvue de tout pouvoir lipasique*. On peut ainsi supposer que le traitement de la masse bactérienne par les solvants organiques (Acétone et Éther) a amené une inactivation ou une destruction des lipases. *Le procédé de purification de la lipase de Mycobacterium phlei au moyen des solvants organiques est donc inutilisable.*

Méthode de dosage de l'activité lipolytique:

Au cours de ces expériences, nous avons essayé de doser l'activité lipolytique par *la méthode modifiée de* DESNUELLE (3). Depuis les travaux de WILLSTÆTTER et de ses élèves (4) on fait agir une dose donnée de ferment sur l'huile d'olive. Il faut noter que la dose d'enzyme ne doit pas excéder 20 mg pour que la méthode soit concluante.

Comme substrat réactionnel, nous avons eu recours à une émulsion de gomme arabique, préparée d'après les indications de CHRISTEN (5) :

Dans un « mixer » on introduit 165 cc d'une solution à 10 % de gomme arabique filtrée, 15 g de glace concassée et 20 cc d'huile d'olive neutre et pure. Nous avons toujours employé *une huile d'olive de la Maison Siegfried de Zofingue (Suisse): Oleum olivarum neutralisatum sterilisatum*, qui se trouve dans le commerce en flacons de 50 cc hermétiquement bouchés. De cette façon, nous pensons avoir eu toutes les garanties de travailler avec un réactif pur et toujours identique. Son conditionnement à l'abri de l'air protège cette huile contre toute oxydation. CHRISTEN a effectué, avec le même produit, une série d'expériences et a pu prouver l'absence d'Acides gras à poids moléculaire faible.

Le mélange est soigneusement homogénéisé dans le « mixer » pendant 15 minutes, puis réparti en petits flacons que l'on conserve à 5° sans altération pendant plusieurs semaines.

Il faut d'autre part préparer les réactifs suivants pour le dosage de l'activité lipasique :

SOLUTION TAMPON :

Solution de Trihydroxyméthylaminométhane Sigma.....	0,005 mol (0,60568 g).
Solution de Chlorure de calcium	0,020 mol (1,0132 g).
Solution de chlorure de sodium	0,040 mol (2,3380 g).
Eau bidistillée q. s. p.	1000 cc.

SOLUTION DE TAUROCHOLATE DE SODIUM A 20 %

Technique du dosage:

Pour le dosage de *nos poudres lipasiques*, nous avons employé un *appareillage* monté par la *Maison Electrona de Strasbourg-Lingolsheim* et dont CHRISTEN et Madame ARNOLD (6) donnent une description détaillée, que nous nous contentons de résumer :

L'appareillage se compose de six parties essentielles :

1) Un pH-mètre avec ses électrodes et un chronomètre.

2) Une calotte chauffante ajustée à la dimension de nos bechers de 50 cc et un thermomètre de contrôle.

3) Un agitateur électro-magnétique.

4) Un bloc magnétique muni d'une microburette pour l'introduction automatique de la solution de NaOH N/10.

5) Un enregistreur automatique avec un appareil de contre-tension et un relais.

6) Un tableau de prises de courant.

Dans le becher de 50 cc, on introduit le mélange réactionnel suivant :

Émulsion de gomme arabique à l'huile d'olive	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate.....	1 cc
Eau bidistillée.....	6 cc.

Ce mélange est chauffé à 37° à l'aide de la calotte chauffante fonctionnant par courant continu à bas voltage, sous agitation constante; on ajuste le pH à 8,2 au moyen de NaOH N/10. A ce moment on met en marche l'appareil enregistreur et l'on ajoute le substrat enzymatique à examiner, suspendu dans 5 cc de mucilage de gomme arabique.

La réaction se déclenche immédiatement et *les acides gras libérés* par l'hydrolyse provoquent une déviation du pH vers l'acidité. Au moment où l'on atteint le pH = 8,0 l'appareil de contre-tension met en fonction le bloc magnétique qui déclenche l'ouverture de la microburette; la solution de NaOH N/10 s'écoule dans le substrat réactionnel jusqu'à obtention d'un pH de 8,2 et à ce moment la microburette se referme automatiquement par interruption de l'appareil de contre-tension. La quantité de NaOH N/10 écoulée dans un temps donné, correspond à une dose d'acide gras mise en liberté par l'hydrolyse de l'huile d'olive au moyen de l'enzyme en expérience.

Expériences au moyen de la lipase de Mycobacterium phlei:

Une culture âgée de six jours est filtrée; le résidu est lavé au moyen d'eau distillée et séché jusqu'à poids constant dans l'exsiccateur sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Nous avons ainsi obtenu après trituration une fine poudre jaunâtre à l'aide de laquelle nous avons effectué les essais suivants :

Essai de solubilité de la lipase dans l'huile d'olive:

Pour examiner si notre bactérie élabore une lipase *liposoluble*, nous introduisons 100 mg de poudre bactérienne déshydratée dans 200 cc d'huile d'olive. Cette suspension est agitée pendant une heure, puis

disposée à la glacière et centrifugée après 12 heures. On décante la phase huileuse surnageante pour examiner son pouvoir lipolytique. A ce sujet, nous avons préparé le substrat réactionnel suivant :

Solution tampon	10 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Mucilage de gomme arabique	10 cc
Eau bidistillée	8 cc.

Ce mélange est introduit dans le becher disposé dans la calotte chauffante et amené à 37° après ajustement à pH = 8,2 à l'aide de NaOH N/10. A ce moment, nous introduisons 2 cc d'huile d'olive à examiner.

L'expérience, étendue sur 15 minutes, s'est avérée négative quant à la présence de lipase.

Pour compléter cette analyse, nous avons également examiné le culot de centrifugation formé par la masse microbienne, en nous servant du même substrat réactionnel. *L'activité lipolytique s'est immédiatement manifesté par virage du pH.*

Nous avons répété ces expériences, pour essayer de mettre en évidence une lipase soluble dans la *glycérine.*

Essai de solubilité de la lipase dans la glycérine :

Nous avons pesé 250 mg de masse bactérienne déshydratée, que nous avons suspendue dans 5 cc de glycérine de densité 1,242 (Codex). Cette suspension est agitée pendant une heure puis conservée pendant 12 heures à l'étuve à 37°: on centrifuge pour séparer le solvant glycériné du culot bactérien. Le substrat réactionnel était composé de :

Solution tampon	8 cc
Émulsion de gomme arabique à l'huile d'olive	10 cc
Solution de taurocholate.....	1 cc
Eau bidistillée	6 cc.

En ce qui concerne les 5 cc de glycérine décantés, nous les avons introduits préalablement dans les 6 cc d'eau distillée. *Ici aussi, la réaction est restée négative, prouvant l'absence de lipase dans le solvant.*

Nous avons jugé nécessaire de contrôler le pouvoir lipasique du culot de centrifugation formé par la masse bactérienne. *Nous avons pu constater une activité lipasique intense dès le début de l'expérience,* ce qui nous permet de conclure que le traitement *des Mycobactéries au moyen de glycérine* n'a aucune action nuisible sur leurs lipases.

Essai de solubilité de la lipase dans l'eau :

Afin de contrôler *l'activité lipasique totale de Mycobacterium phlei,* nous avons tout d'abord effectué des recherches en suspension aqueuse préparée de la façon suivante :

Poudre de Mycobacterium phlei déshydratée	1 g
Mucilage de gomme arabique	42 cc
Glace concassée	7 g.

On mélange énergiquement au « mixer » préalablement refroidi pour obtenir une suspension homogène. On introduit 2 cc de cette suspension dans notre substrat réactionnel, ce qui correspond à 40 mg de bactéries desséchées.

Le substrat réactionnel est le suivant :

Émulsion de gomme arabique à l'huile d'olive ...	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	9 cc.

Le tout est porté dans la calotte chauffante à 37° et après addition de 2 cc de notre suspension enzymatique, *la réaction lipolytique se manifeste immédiatement.* Nous l'avons contrôlée pendant une heure et donnons dans le tableau suivant le taux de NaOH N/10 nécessaire pour la neutralisation des acides gras mis en liberté.

TABLEAU N° 1

Temps de réaction en minutes	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
NaOH N/10 gouttes	10	16	21	27	33	40	47	53	59	65
Temps de réaction en minutes	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60
NaOH N/10 gouttes	71	78	84	90	96	102	108	113	118	123

Interprétation :

Les 40 mg de poudre déshydratée de *Mycobacterium phlei* mis en suspension aqueuse ont donné un pouvoir lipolytique assez intense, diminuant progressivement. Nous avons porté ces résultats dans un graphique, en inscrivant en abscisse le temps en minutes et en ordonnée le nombre de gouttes de NaOH N/10.

On obtient une courbe *en hyperbole*, dont le début est très raide et qui évolue ensuite suivant un tracé se rapprochant de plus en plus de l'horizontale, montrant l'épuisement progressif de l'enzyme.

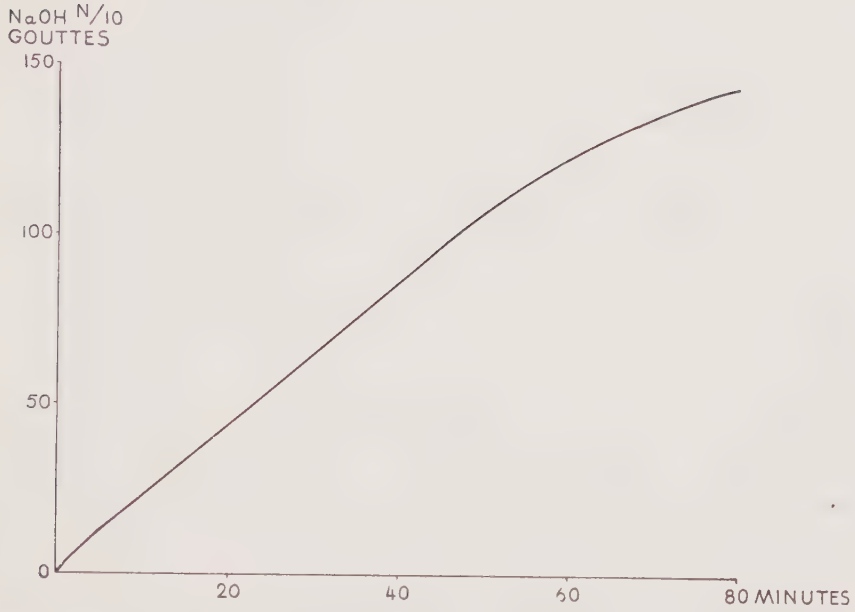

Fig. 1. — Activité lipolytique d'une suspension aqueuse de 40 mg de Mycobacterium phlei sur l'huile d'olive.

Ce tracé correspond à la courbe classique des lipases, comme CHRISTEN et nous-même avons pu le constater au moyen de lipase pancréatique.

Pour contrôler si *notre lipase bactérienne est soluble, partiellement ou totalement, dans l'eau*, nous avons préparé une suspension aqueuse au moyen de 1 g de poudre microbienne et 50 cc d'eau distillée. Cette suspension a été agitée mécaniquement pendant 2 heures, puis nous l'avons disposée à la glacière pendant 24 heures. Nous avons ensuite séparé la phase aqueuse par centrifugation pour examiner son pouvoir lipolytique. *Les résultats de cet essai sont restés complètement négatifs.*

Essai de libération de la lipase par un broyage mécanique:

Partant du raisonnement que la lipase de *Mycobacterium phlei* est une *endoenzyme*, impossible à libérer par extraction simple au moyen *d'huile, de glycérine ou d'eau*, nous avons essayé de broyer finement nos bactéries avant l'extraction.

Le procédé le plus pratique semblait être le broyage de la poudre microbienne en présence de sable de quartz stérile. A cet effet, nous avons eu recours à un *broyeur électrique contruit par* HIRTZ, *auquel nous présentons ici nos plus vifs remerciements*. Celui-ci est constitué d'un tambour de procelaine dans lequel tournent des boules de porcelaine qui, par leur rotation continuelle broient, en présence du sable de

quartz, la masse bactérienne. Nous avons effectué des prélèvements à différents stades de ce broyage; nous avons confectionné des frottis et les avons colorés au *Ziel-Neelsen* pour les examiner au microscope. Nous avons ainsi pu constater qu'un broyage de 6 heures suffit pour dilacérer la plupart des éléments cellulaires; en effet on ne trouve plus, à l'examen microscopique, que de rares cellules intactes.

Nous nous sommes servi de ces bactéries broyées pour effectuer les mêmes essais de solubilité que précédemment; nous avons constaté *qu'aucune trace de lipase* n'était entrée en solution dans nos trois réactifs.

Nous avons alors procédé à des réactions supplémentaires et avons pu constater les faits suivants :

L'activité lipasique avait fortement diminué dans la suspension microbienne aqueuse et le taux de NaOH N/10 nécessaire pour neutraliser *les acides gras libérés* se montait à moins de 50 % de celui nécessaire pour la suspension aqueuse non broyée.

La poudre broyée est mise en suspension dans l'eau, agitée comme antérieurement et centrifugée pour séparer la phase aqueuse; *celle-ci ne montrait aucune activité lipasique.*

La même poudre, mise en suspension dans *l'huile d'olive*, est agitée puis centrifugée pour séparer la phase huileuse *qui ne présente non plus aucune trace de lipase liposoluble.*

Essai de libération de la lipase par bactériolyse enzymatique au moyen de la Papaïne:

Après avoir constaté que la lipase de *Mycobacterium phlei* ne peut pas être libérée par broyage mécanique des bactéries, nous avons essayé de contrôler s'il s'agit d'une *desmolase* liée intimement au protoplasme et ne pouvant être séparée que par des réactions chimiques ou enzymatiques.

Nous avons ainsi traité nos *cultures de Mycobacterium phlei* en milieu aqueux au moyen de la *Papaïne.* Un gramme de masse bactérienne déshydratée a été mis en suspension dans :

Mucilage de gomme arabique	42	g
Glace concassée	8	g
Papaïne	0,1	g.

La suspension homogénéisée a été ajustée à pH = 7,0 et disposée pendant 48 heures à l'étuve à 37°. Nous avons d'autre part préparé le substrat réactionnel :

Émulsion de gomme arabique à l'huile d'olive	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate.....	1 cc
Eau bidistillée	9 cc.

Pour examiner l'activité lipasique de notre *suspension papaïnée*, nous avons introduit 2 cc de cette dernière dans le substrat réactionnel. Nous avons constaté que l'activité lipasique était épuisée après 33 minutes avec une consommation totale de 33 gouttes de NaOH N/10.

Des essais comparatifs, à l'aide des mêmes masses bactériennes non traitées à la Papaïne, *nous ont montré que l'activité lipasique était fortement diminuée par l'action de la Papaïne.* La quantité de NaOH N 10 nécessaire par rapport à la durée de l'expérience était supérieure de 50 % de celle de l'essai à la Papaïne.

D'autre part, *nos essais sur la solubilité de la lipase phléique traitée à la Papaïne ont donné un résultat négatif en ce qui concerne l'huile et l'eau.*

Essai de solubilisation de la lipase phléique dans des solutions tampon:

Ayant constaté que le pH des suspensions aqueuses de *Mycobacterium phlei* vire vers l'acidité, par la bactériolyse, nous avons pensé qu'il serait possible de solubiliser la lipase dans l'eau *au moyen de solution tampon de différents pH.* Pour ces essais nous avons préparé les solutions tampon suivantes d'après KORDATZKI (7).

TAMPON DE PH = 6,0 :

Citrate de soude	59,5 cc
NaOH N/10	40,5 cc.

La solution citratée est préparée au moyen de 21,008 g d'Acide citrique dans 200 cc de NaOH N. Le tout est complété à 1 000 cc au moyen d'eau distillée.

TAMPON DE PH = 8,0 :

Solution de Borate de soude	55,9 cc
HCl N/10	44,1 cc.

La solution de Borate de soude est à 19,1 g dans 1 000 cc d'eau.

TAMPON DE PH = 10,0 :

Solution de Borate de soude	59,5 cc
NaOH N/10	40,5 cc.

TAMPON DE PH = 11,0 :

Solution de Borate de soude	50,2 cc
NaOH N/10	49,8 cc.

Nous avons introduit 500 mg de poudre de *Mycobacterium phlei* dans 20 cc de ces différentes solutions tampon, agité pendant une heure et

disposé pendant 24 heures à l'étuve à 37°. Après ce temps, nous avons contrôlé les pH qui avaient peu varié :

pH initial	*pH final*
6,0	6,0
8,0	7,7
10,0	9,6
11,0	9,9

Après centrifugation, nous avons décanté les phases aqueuses des résidus bactériens et les avons examinées quant à leur activité lipasique. Les résultats ont été négatifs.

Les résidus bactériens, par contre, avaient conservé intégralement leur activité lipasique.

Essai de libération de la lipase phléique par traitement aux solutions normales de HCl et de NaOH à 50° :

Nous avons mélangé la poudre de *Mycobacterium phlei* déshydratée avec les solutions normales de HCl et de NaOH, puis nous les avons disposées pendant 24 heures à 37° en agitant souvent. On traite ensuite les suspensions par un chauffage à 50° pendant une heure. On laisse refroidir et on centrifuge. La phase aqueuse décantée est ajustée à pH = 8,2 et examinée quant à son activité lipasique. *Ni la solution acide ni la solution alcaline ne présentaient d'activité lipasique.*

Les résidus bactériens ont été contrôlés également : celui traité par la solution de HCl avait conservé une faible activité lipasique, tandis que le résidu bactérien traité par le NaOH avait perdu toute action enzymatique. Les deux résidus bactériens ont été épuisés ensuite par l'Éther sulfurique; l'extrait éthéré a été évaporé, les résidus repris dans 2 cc d'huile d'olive et examinés *quant à leur activité lipasique* qui *faisait complètement défaut.*

Après avoir échoué dans *nos tentatives de mise en solution de la lipase de Mycobacterium phlei*, nous avons jugé nécessaire de contrôler la bonne marche de nos méthodes en employant des extraits lipasiques connus.

CHAPITRE II

ESSAI SUR LA DÉGRADATION LIPASIQUE DE DIFFÉRENTS PHOSPHOLIPIDES

Nous avons trouvé intéressant d'examiner l'activité lipasique vis-à-vis *d'un phospholipide* à titre de comparaison avec l'huile d'olive comme substrat réactionnel. Nous avions à notre disposition *un produit allemand « Lipostabil »*(*) en solution aqueuse conditionné en ampoules et destiné à l'injection intraveineuse.

Ces ampoules contiennent, d'après les indications du fabricant, *des Vitamines*, *de l'Adénosine-triphosphate* et 250 mg de *Phospholipides* essentiels. Il s'agit d'une combinaison de *phospholipides*, composés d'acides gras essentiels 2 et 3 fois non-saturés et hautement purifiés, et de *Choline*.

Nous avons examiné le pouvoir enzymatique des différentes préparations de *lipases sur ces phospholipides*, en employant les mêmes techniques que précédemment. Les préparations lipasiques étaient les suivantes :

— une suspension de *zoolipases (pancréas)* dans le mucilage de gomme arabique;

— une suspension de *bactériolipases (Mycobacterium phlei)* dans le mucilage de gomme arabique;

— une suspension de *phytolipases fongiques (Candida lipolytica)* dans le mucilage de gomme arabique. Cette dernière préparée par E. Arnold-Meyer.

Pour réaliser nos expériences, nous étions obligé d'employer respectivement 10 mg de *lipase pancréatique*, 100 mg de *lipase mycobactérienne* et 100 mg de *lipase fongique*, qui ont chaque fois été mis en suspension dans 10 cc de mucilage de gomme arabique. Nous avons préparé ces suspensions d'enzymes de la façon suivante :

(*) Nous tenons à exprimer ici nos remerciements à la Maison Nattermann de *Cologne. Allemagne.*

1) Lipase pancréatique..... 0,10 g
Mucilage de gomme arabique ..... 83,0 g
Glace concassée ..... 17,0 g

2) Lipase mycobactérienne ..... 1,0 g
Mucilage de gomme arabique ..... 82,0 g
Glace concassée ..... 17,0 g

3) Lipase fongique ..... 1,0 g
Mucilage de gomme arabique ..... 82,0 g
Glace concassée ..... 17,0 g.

Ces suspensions étaient préparées dans le « mixer » refroidi et conservées ensuite à la glacière jusqu'à l'emploi.

Mode opératoire:

Nous avons employé le substrat réactionnel suivant :

Lipostabil pour injection ..... 2 cc
Solution tampon ..... 8 cc
Solution de taurocholate ..... 1 cc
Eau bidistillée ..... 9 cc
Suspension enzymatique ..... 10 cc.

Nous exprimons les résultats dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 2

Lipostabil + lipase	Gouttes de NaOH N /10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
pancréatique	24	35	42	46	50	54	58	62	66	70
mycobactérienne	12	22	30	40	48	56	62	71	77	81
fongique	12	18	24	32	40	47	52	56	59	62

Nous avons jugé intéressant de faire en même temps des essais de l'activité de *ces diverses lipases sur l'huile d'olive* mise en suspension dans le mucilage de gomme arabique. Le substrat réactionnel était le suivant :

Émulsion de gomme arabique à 10 % d'huile d'olive ..	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	1 cc
Suspension enzymatique	10 cc.

Nous rapportons dans le tableau la quantité de NaOH N 10 nécessaire pour neutraliser les acides gras dégradés par le processus enzymatique :

TABLEAU N° 3

Huile d'olive + lipase	Gouttes NaOH N/10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
pancréatique	162	296	390	438	468	500	522	539	553	565
mycobactérienne	17	46	82	111	140	169	200	228	253	280
fongique	76	142	202	264	320	362	410	445	480	505

En considérant ces valeurs, on note que *l'huile d'olive* est dégradée d'une façon plus ou moins rapide et complète et ceci dans l'ordre décroissant suivant :

1) *lipase pancréatique*
2) *lipase fongique*
3) *lipase mycobactérienne.*

Si l'on emploie comme substrat réactionnel *un phospholipide* à la place *de l'huile d'olive* (ester d'acide gras à poids moléculaire élevé), on note également une dégradation enzymatique décroissante, mais dans l'ordre suivant :

1) *lipase mycobactérienne*
2) *lipase pancréatique*
3) *lipase fongique.*

La différence quantitative de cette activité *des diverses lipases employées sur le phospholipide* ressort encore beaucoup plus si on prolonge les mesures par exemple à 60 minutes. On constate dans ces conditions une consommation de NaOH N/10 correspondant à :

121 gouttes pour la lipase mycobactérienne,
80 gouttes pour la lipase pancréatique,
70 gouttes pour la lipase fongique.

Nous pensons pouvoir exprimer l'activité hydrolytique des différentes lipases sur le substrat réactionnel en pourcentage, en choisissant chaque fois l'enzyme le plus actif comme valeur 100 %. Nous obtenons alors les résultats suivants :

1) *Dégradation de l'huile d'olive :*

Lipase pancréatique ..... 100 %
Lipase fongique ..... 89,4 %
Lipase mycobactérienne ..... 49,6 %.

2) *Dégradation des phospholipides :*

Lipase mycobactérienne ..... 100 %
Lipase pancréatique ..... 66,1 %
Lipase fongique ..... 57,8 %.

Si l'on compare l'*activité lipasique des différentes enzymes vis-à-vis de l'huile d'olive et des phospholipides*, on constate que le pouvoir lipolytique est nettement supérieur pour l'huile d'olive. En posant l'activité lipasique vis-à-vis de l'huile d'olive comme 100 %, l'activité vis-à-vis des phospholipides mesurée par la consommation en NaOH N/10 des différentes enzymes est nettement inférieure, ce qui ressort du tableau suivant :

TABLEAU N° 4

Lipases	Huile d'olive	Phospholipides
pancréatique	100 %	14 %
mycobactérienne	100 %	43 %
fongique	100 %	14 %

Nous avons ainsi pu constater que l'*activité lipolytique vis-à-vis de l'huile d'olive* est la plus prononcée pour *la lipase pancréatique*, suivie de la lipase de *Candida lipolytica* puis par celle de *Mycobacterium phleï*. L'action lipolytique vis-à-vis *des phospholipides* se manifeste tout autrement, puisqu'elle est la plus prononcée pour *la lipase de Mycobacterium phleï, suivie par la lipase pancréatique et enfin par la lipase fongique.*

Nous exprimons les résultats ainsi obtenus avec les deux substrats réactionnels dans le graphique suivant, où nous inscrivons en ordonnée le nombre de gouttes de NaOH N/10 employé pour saturer les acides gras libérés et en abscisse la durée de réaction en minutes.

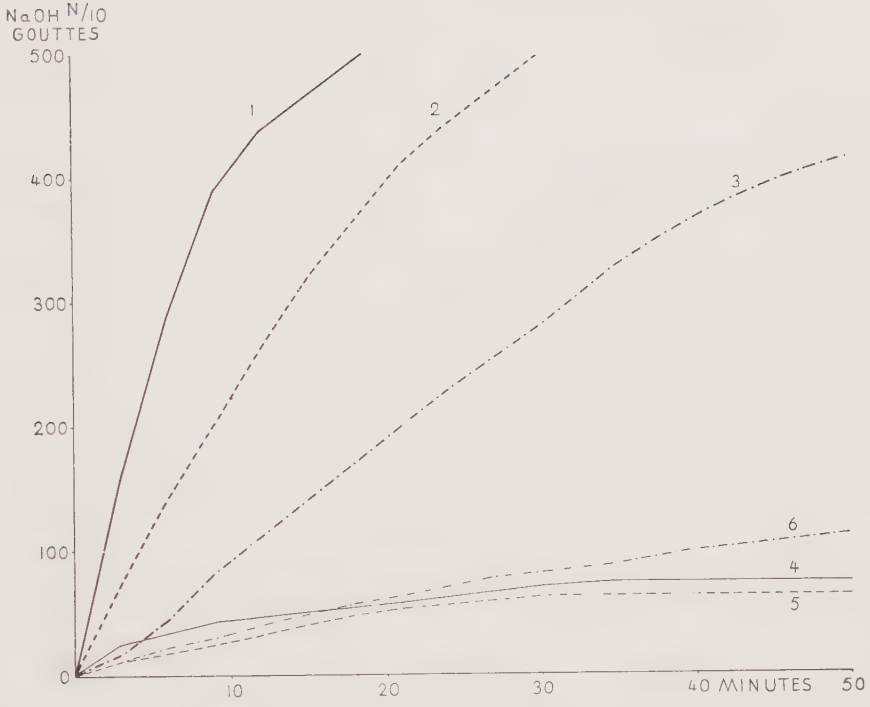

Fig. 2. — Activité lipolytique de :

1° 10 mg de lipase pancréatique sur l'huile d'olive;
2° 100 mg de lipase fongique sur l'huile d'olive;
3° 100 mg de lipase mycobactérienne sur l'huile d'olive;
4° 10 mg de lipase pancréatique sur le Lipostabil;
5° 100 mg de lipase fongique sur le Lipostabil;
6° 100 mg de lipase mycobactérienne sur le Lipostabil.

Essai sur la dégradation de deux phosphatides et d'un phospholipide :

Nous avions à notre disposition *trois phospholipides* préparés par la *Maison* NATTERMANN *de Cologne* qui nous a fourni les renseignements suivants :

1) *Soja-phosphatides :* il s'agit d'un produit de purification à partir des *phosphatides bruts de graines de Soja.* Ce produit purifié doit contenir environ 70 à 75 % de *Choline-phosphatides* et le reste est constitué par *la Céphaline.* L'aspect macroscopique de ce produit rappelle celui de *la Lanoline,* à faible odeur de *Lécithine ;* il peut être facilement mis en suspension dans l'eau.

2) *Choline-phospholipides :* il doit s'agir ici d'un produit hautement purifié contenant 100 % de *Choline* dans la fraction basique de

sa molécule. La consistance et la couleur rappellent la *Vaseline jaune ;* ce produit peut facilement être suspendu dans l'eau.

3) *Colamine et Inositophosphatides :* ce produit est un dérivé secondaire isolé au cours de la préparation *des Soja-phosphatides ;* il est brun foncé, grumeleux, se laisse pétrir sans coller à la peau; il a une odeur aromatique agréable et peut facilement être suspendu dans l'eau.

Pour réaliser nos essais, nous avons préparé les suspensions suivantes :

Produit lipidique à étudier	1 g
Mucilage de gomme arabique	82 cc
Glace concassée	17 g.

Pour chaque expérience, nous avons utilisé 10 cc de la suspension. Ces substrats lipidiques étaient éprouvés par nos trois suspensions de Lipases, à savoir :

Lipase pancréatique	10 mg
Lipase fongique	100 mg
Lipase mycobactérienne	100 mg.

Nous avons ainsi pu constater les faits suivants : *la lipase pancréatique* a hydrolysé le plus activement la suspension de *Choline-phospholipides*, un peu moins intensément la suspension des *Soja-phosphatides* et très peu la suspension des *Colamine-inositophosphatides.*

La lipase fongique a dégradé *le Soja-phosphatide et les Choline-phospholipides* avec une intensité sensiblement égale, tandis que son activité vis-à-vis de la suspension des *Colamine-inositophosphatides* est relativement faible.

La lipase mycobactérienne s'est montrée pendant les premières 15 minutes aussi active sur la suspension de *Choline-phospholipides* que sur celle de *Colamine-inositophosphatides.* Dans la deuxième phase de la réaction, l'intensité lipolytique reste sensiblement identique vis-à-vis de la suspension *de Cholinephospholipides*, tandis qu'elle diminue pour la suspension de *Colamine-inositophosphatides. La lipase mycobactérienne* a un pouvoir lipolytique très faible sur les *Soja-phosphatides.*

Nous donnons les détails de cette expérience dans le graphique N° 3 où nous enregistrons en abscisse le nombre de gouttes de NaOH N/10 utilisées et en ordonnée la durée de la réaction en minutes.

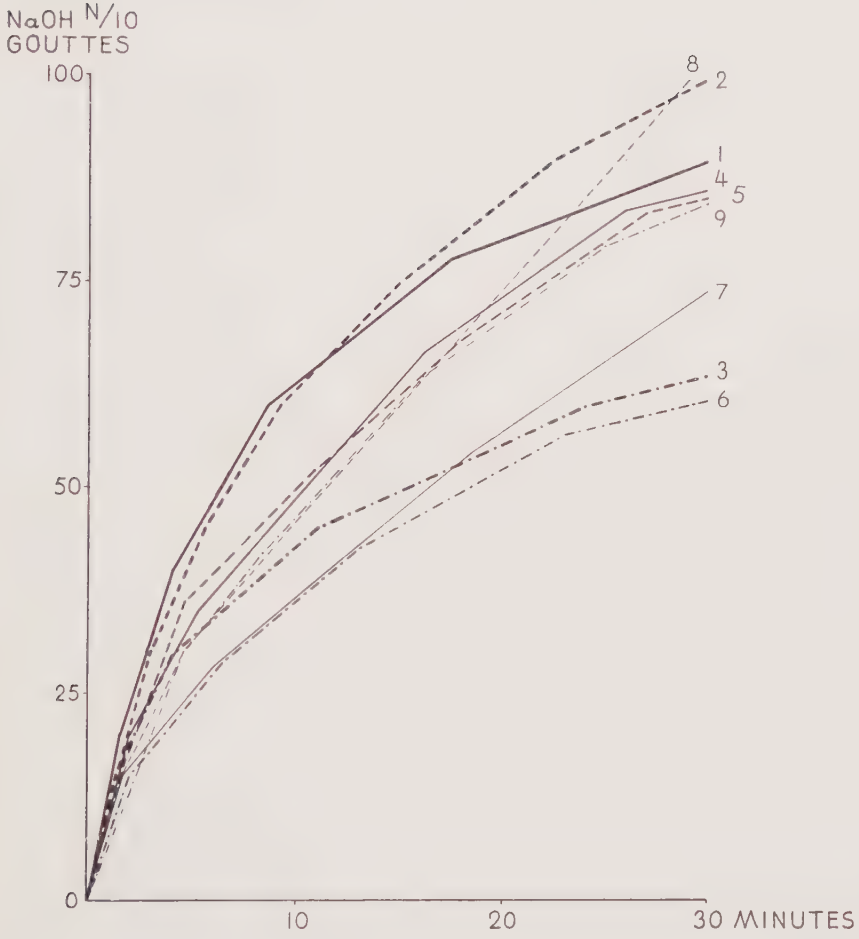

Fig. 3. — Activité lipolytique de:

1° 10 mg de lipase pancréatique sur le phosphatide de soja;
2° 10 mg de lipase pancréatique sur le cholinephospholipide;
3° 10 mg de lipase pancréatique sur le colamininositophosphatide;
4° 100 mg de lipase fongique sur le phosphatide de soja;
5° 100 mg de lipase fongique sur le cholinephosphatide;
6° 100 mg de lipase fongique sur le colamininositophosphatide;
7° 100 mg de lipase mycobactérienne sur le phosphatide de soja;
8° 100 mg de lipase mycobactérienne sur le cholinephosphatide;
9° 100 mg de lipase mycobactérienne sur le colamininositophosphatide.

Essai de dégradation lipasique d'un Phospholipide essentiel, la Lécithine:

Les essais qui suivent ont été effectués pour examiner si *la Lécithine* pouvait servir de substrat réactionnel à nos différentes enzymes.

Nous avons encore utilisé les mêmes suspensions que précédemment à raison de :

Lipase pancréatique	10 mg
Lipase fongique	100 mg
Lipase mycobactérienne	100 mg.

Nous avons préparé d'autre part une émulsion de Lécithine :

Lécithine ex ovo	1 g
Mucilage de gomme arabique	82 g
Glace concassée.....	17 g.

Cette émulsion est préparée au moyen du « mixer » refroidi et conservée à la glacière.

Le substrat réactionnel définitif avait la composition suivante :

Émulsion de lécithine	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	1 cc
Suspension enzymatique	10 cc.

L'enregistrement de la dégradation a été poursuivi pendant une heure et nous avons dosé la quantité de NaOH N /10 employée, comme cela ressort des tableaux suivants :

TABLEAU N° 5

Lécithine + lipase	Gouttes NaOH N /10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
pancréatique	18	37	49	58	66	74	78	83	87	92
mycobactérienne	15	30	44	53	64	76	86	97	107	116
fongique	11	25	38	43	48	53	60	68	77	86

TABLEAU N° 6

Lécithine + lipase	Gouttes NaOH N/10 — Temps en minutes									
	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60
pancréatique	95	98	98	98	98	98	98	98	98	98
mycobactérienne	125	133	140	148	157	166	174	184	195	205
fongique	95	104	113	123	133	145	153	161	168	174

Interprétation :

Il ressort de ces expériences que *la lipase pancréatique* attaque la *Lécithine* très lentement et avec une activité enzymatique très restreinte. En effet, dans notre essai, l'hydrolyse s'est définitivement arrêtée après 36 minutes avec une consommation de 98 gouttes de NaOH N/10.

La lipase de Candida lipolytica ne dégrade pas plus vite *la Lécithine*, mais la durée de son activité se maintient au-delà d'une heure.

La lipase de Mycobacterium phleï hydrolyse *la Lécithine* le plus rapidement par rapport aux autres lipases et son activité est la plus intense.

Cette interprétation n'est valable qu'en prenant en considération les doses d'enzyme respectives mises en œuvre.

Essai différentiel de l'action de nos lipases sur le jaune d'œuf et la Lécithine :

Pour ces essais, nous avons préparé le substrat réactionnel suivant :

Émulsion de jaune d'œuf à 0,4 g	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée.....	6 cc
Suspension enzymatique	5 cc.

Les réactions ont été effectuées entre pH 8,0 et 8,2 et à la température de 37°.

Nous avons ainsi pu comparer l'action de *notre lipase pancréatique et de notre lipase mycobactérienne sur le jaune d'œuf et la Lécithine*. Nous avons pu constater que *la lipase pancréatique* nécessite une consommation de NaOH N/10 plus forte pour dégrader le jaune d'œuf que pour la Lécithine. On peut en conclure que *la lipase pancréatique* contient, en dehors *d'une Lécithinase, d'autres lipases* intervenant dans l'hydrolyse du jaune d'œuf.

Le cas est inversé pour *la lipase mycobactérienne*, puisque pour la dégradation du jaune d'œuf la consommation de NaOH N /10 se chiffre à 67 gouttes pour les 60 minutes de l'expérience, alors que dans le même temps, il faut 205 gouttes pour l'hydrolyse de *la Lécithine*. On peut en conclure que dans nos conditions expérimentales *les Lécithinases de Mycobacterium phleï* sont plus actives que les autres enzymes lipolytiques et que notre extrait de *Mycobacterium phleï* doit contenir une forte proportion de *Lécithinase pure.*

Dans le graphique suivant, nous illustrons l'activité lipasique de nos trois extraits *de pancréas, de Candida lipolytica et de Mycobacterium phleï* sur une suspension à 1 % *de Lécithine.*

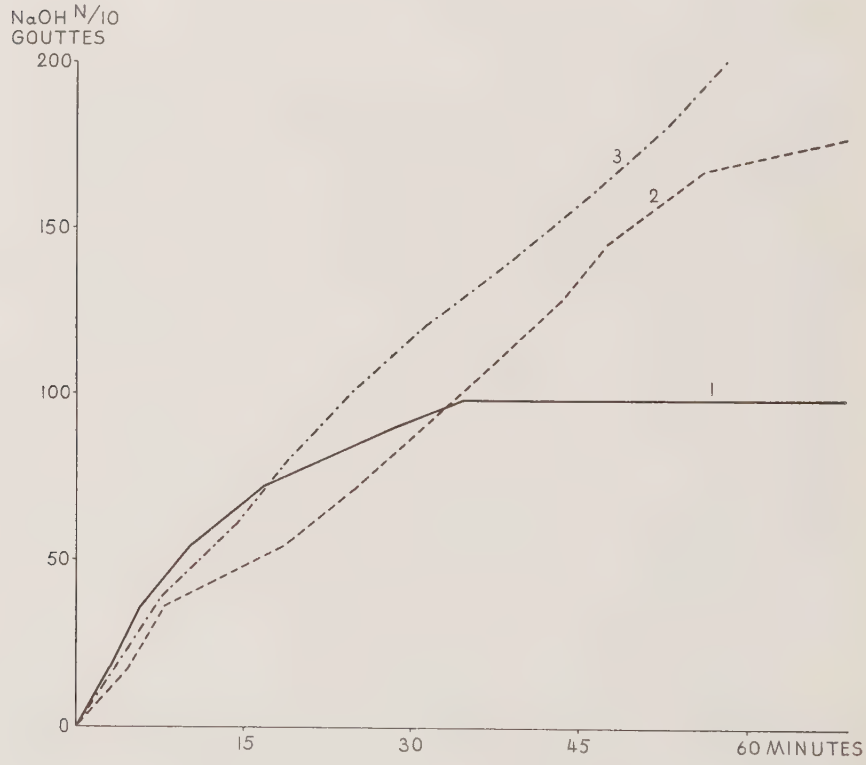

Fig. 4. — Activité lipolytique de :

1° 10 mg de lipase pancréatique sur la lécithine;
2° 100 mg de lipase fongique sur la lécithine;
3° 100 mg de lipase mycobactérienne sur la lécithine.

Essai de l'activité enzymatique sur la Lécithine entre pH 7,0 et 7,2:

Les expériences précédentes ont toutes été effectuées à des pH situés entre 8,0 et 8,2. D'après AMMON et DIRSCHERL (8) les Lécithines peuvent être considérées comme des esters gras de glycérophosphate α et β de Choline combinés avec des Acides aminés et contenant dans leur molécule quatre composants d'esters différents; il faut donc supposer que leur dégradation complète nécessite l'intervention de différentes enzymes lipolytiques. Pour examiner si l'une ou l'autre enzyme de ce complexe a son optimum de pH entre 8,0 et 8,2 ou à 7,0-7,2, nous avons effectué des essais comparatifs dans ces zones de concentration ionique.

Nous avons ainsi constaté que *la lipase pancréatique* est dépourvue d'activité après 30 minutes à pH 7,0 à 7,2: la consommation en NaOH N 10 se chiffre seulement à 35 % de celle nécessaire en expérimentant à pH = 8,0 à 8,2.

La lipase fongique ne travaille pas du tout entre pH 7,0 et 7,2: *la Lécithine* n'est par conséquent pas hydrolysée.

Pour la lipase mycobactérienne, la consommation en NaOH N/10 se monte seulement à 40 % dans la zone de pH allant de 7,0 à 7,2 et la réaction est terminée après 32 minutes.

On voit ainsi que l'*activité lipolytique des trois lipases* est nettement plus prononcée en travaillant dans la zone alcaline, surtout en ce qui concerne les Lécithines comme substrat réactionnel.

CHAPITRE III

ESSAI DU POUVOIR LIPOLYTIQUE DE DIFFÉRENTES TOXINES STAPHYLOCOCCIQUES VIS-A-VIS DU JAUNE D'ŒUF

Nous avions à notre disposition *une toxine du Staphylocoque Bouley* que nous avait procurée RICHOT (9) et qu'il avait trouvée lipolytique vis-a-vis du jaune d'œuf. Nous avons tout d'abord examiné le pouvoir lipolytique de cette toxine au moyen d'un substrat réactionnel à *l'huile d'olive* et n'avons pu déceler aucune trace de lipase contre ces esters à poids moléculaire élevé.

D'après les indications de RICHOT et ses collaborateurs (10) nous avons préparé un substrat réactionnel au moyen *de jaune d'œuf*, en modifiant cependant comme suit la méthode de cet auteur qui travaille en boîte de Pétri sur un milieu gélosé :

Jaune d'œuf	20 g
Soluté physiologique.....	17 cc
Mucilage de gomme arabique	13 cc.

Ces trois produits sont soigneusement mélangés dans le « mixer » pour obtenir une émulsion homogène que nous conservons à la glacière.

Dans nos essais, nous avons toujours employé 10 cc de cette suspension, ce qui correspond à 4 g de jaune d'œuf, comme RICHOT le préconise.

Simultanément, nous avons effectué un essai témoin en employant *notre lipase pancréatique* ; pour celui-ci, nous avons préparé le substrat réactionnel suivant :

Émulsion de jaune d'œuf	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	6 cc.

Nous avons introduit dans ce substrat réactionnel 5 cc de notre suspension lipasique :

Lipase pancréatique	100 mg
Mucilage de gomme arabique	83 cc
Glace concassée	17 g

ce qui correspond à 5 mg de poudre lipasique dans 5 cc de suspension.

La consommation de NaOH N /10 était de 36 gouttes en 11 minutes de réaction effectuée entre pH = 8,0 et 8,2. On pourrait ainsi conclure que *l'activité lipasique de notre poudre de pancréas serait très faible vis-à-vis du jaune d'œuf.*

Pour contrôler la dégradation du jaune d'œuf par notre poudre de pancréas, nous avons disposé le mélange pendant 15 heures à l'étuve à 37°, en agitant fréquemment et après ce temps, nous avons mesuré un pH de 6,2. Pour ramener le mélange réactionnel au pH initial de 8,2 il nous fallait 700 gouttes de NaOH N /10. Cette valeur très élevée fait supposer que le jaune d'œuf est *un système tampon biologique* très stable et la mesure des variations de la concentration en ions H semble impossible par notre méthode.

C'est pour cette raison que nous avons repété l'expérience à *l'aide de la lipase pancréatique en employant une émulsion de jaune d'œuf diluée 10 fois*, préparée de la façon suivante :

Jaune d'œuf	20 g
Soluté physiologique	300 cc
Mucilage de gomme arabique q. s. p. ..	500 cc.

Le substrat réactionnel était ensuite préparé de la façon suivante :

Émulsion de jaune d'œuf diluée	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	6 cc
Suspension de poudre pancréatique ..	5 cc.

La consommation en NaOH N /10 ressort du tableau suivant :

TABLEAU N° 7

Temps en minutes	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
NaOH N /10 gouttes	9	17	25	39	52	70	85	98	114	130
Temps en minutes	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60
NaOH N /10 gouttes	143	154	162	172	177	180	183	184	185	186

L'activité lipasique était épuisée après les 60 minutes de réaction, comme cela ressort du tableau.

Nous voyons ainsi que *la poudre de pancréas a dégradé la suspension diluée de jaune d'œuf* et on peut par conséquent conclure à la présence d'un complexe de lipases. L'expérience ne permet cependant pas de définir s'il s'agit de *lipases proprement dites* agissant sur les esters

d'acides gras supérieurs ou de *lécithinases*, ce que nous allons essayer d'élucider plus loin.

Le graphique ci-dessous illustre l'action de la poudre de pancréas sur la suspension de jaune d'œuf diluée :

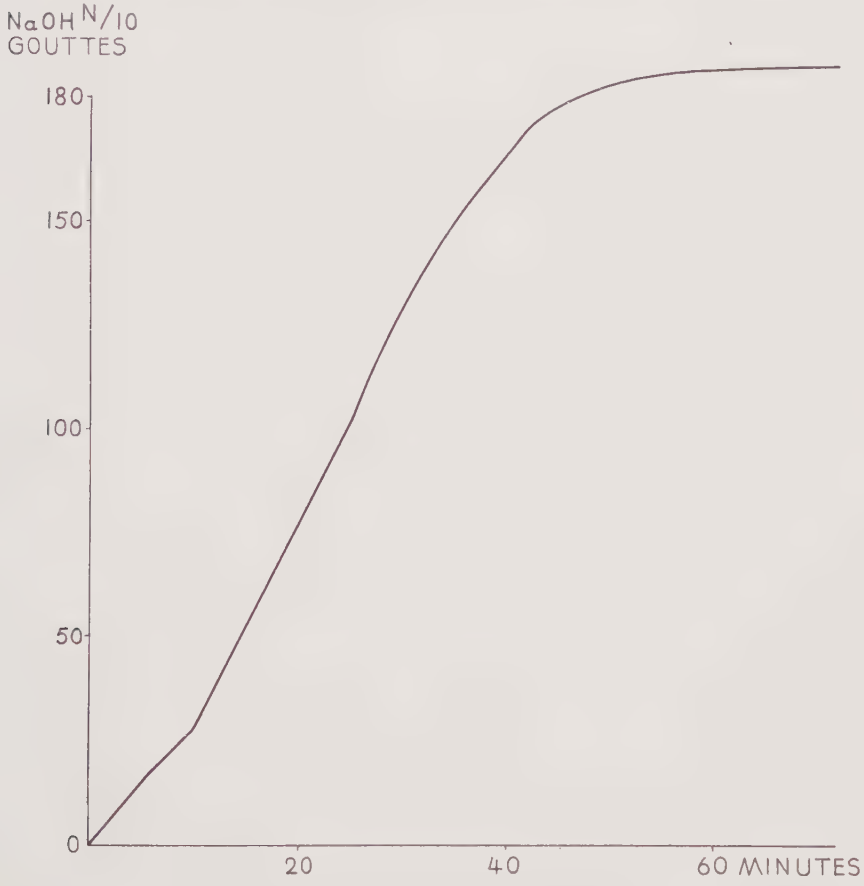

Fig. 5. — Activité lipolytique de 5 mg de lipase pancréatique sur le jaune d'œuf.

Ayant ainsi mis notre technique au point, nous allons examiner l'*activité lipasique des toxines staphylococciques sur le jaune d'œuf*. Pour ces expériences, nous avons utilisé *trois toxines*, gracieusement mises à notre disposition par le *Docteur* Richou : il s'agissait *des toxines* des *souches Bouley, Hautefort et Wood*. Cette dernière toxine ne présentait aucune activité lipasique vis-à-vis de notre suspension de jaune d'œuf. Les toxines *Bouley* et *Hautefort* ont une certaine activité : La toxine nº 2 013 *du Staphylocoque Bouley* a dégradé le jaune d'œuf avec une libération d'acides gras nécessitant pour la neutralisation 33 gouttes de NaOH N /10 en 60 minutes. Celle du *Staphylocoque Hautefort* (nº 2 069) demandait dans les mêmes conditions 42 gouttes de NaOH N /10.

Nous avons complété cette expérience, en employant *à la place du jaune d'œuf un substrat à base de Butyrate d'éthyle* pour déceler éventuellement des Estérases. Cette expérience donna un résultat négatif.

Par la suite, nous avons examiné l'activité lipolytique *d'une toxine de la souche de Staphylocoque* n° 2 185 *provenant également de la collection du Docteur* Richou. Cette expérience était effectuée sur un substrat réactionnel à base d'huile d'olive. Nous avons employé 1 cc de la toxine qui se présente comme un liquide jaunâtre limpide. Comme substrat, nous avons employé 10 cc de notre émulsion d'huile d'olive dans le mucilage de gomme. Nous donnons ci-dessous les résultats de cet essai.

TABLEAU N° 8

Temps en minutes	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
NaOH N/10 gouttes	21	42	64	88	108	130	148	169	189	206
Temps en minutes	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60
NaOH N/10 gouttes	224	239	256	270	285	299	313	326	337	348

En considérant ces résultats on note que l'*activité lipasique* de 1 cc de cette *toxine staphylococcique* n'est pas encore épuisée après une heure. Comme on le voit, cette toxine travaille très rapidement et avec une intensité qui correspond sensiblement à 100 mg de notre poudre lipasique de *Mycobacterium phleï.*

Nous donnons ci-contre le graphique original illustrant l'activité de *cette toxine staphylococcique.*

Action lipolytique de notre poudre de Mycobacterium phleï et de la toxine staphylococcique n° 2 185 sur le jaune d'œuf:

Pour contrôler l'action de notre suspension aqueuse *de poudre de Mycobacterium phleï et de la toxine staphylococcique* vis-à-vis du jaune d'œuf, nous avons préparé le substrat réactionnel suivant :

Émulsion de jaune d'œuf à 0,4 g	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	9 cc.

Avec la poudre *de Mycobacterium phleï*, nous avons préparé une suspension en incorporant 1 g dans 89 g de mucilage de gomme refroidi comme d'habitude. La réaction est effectuée avec 2 cc (40 mg de *Mycobacterium phleï)* de cette suspension; la deuxième expérience est pra-

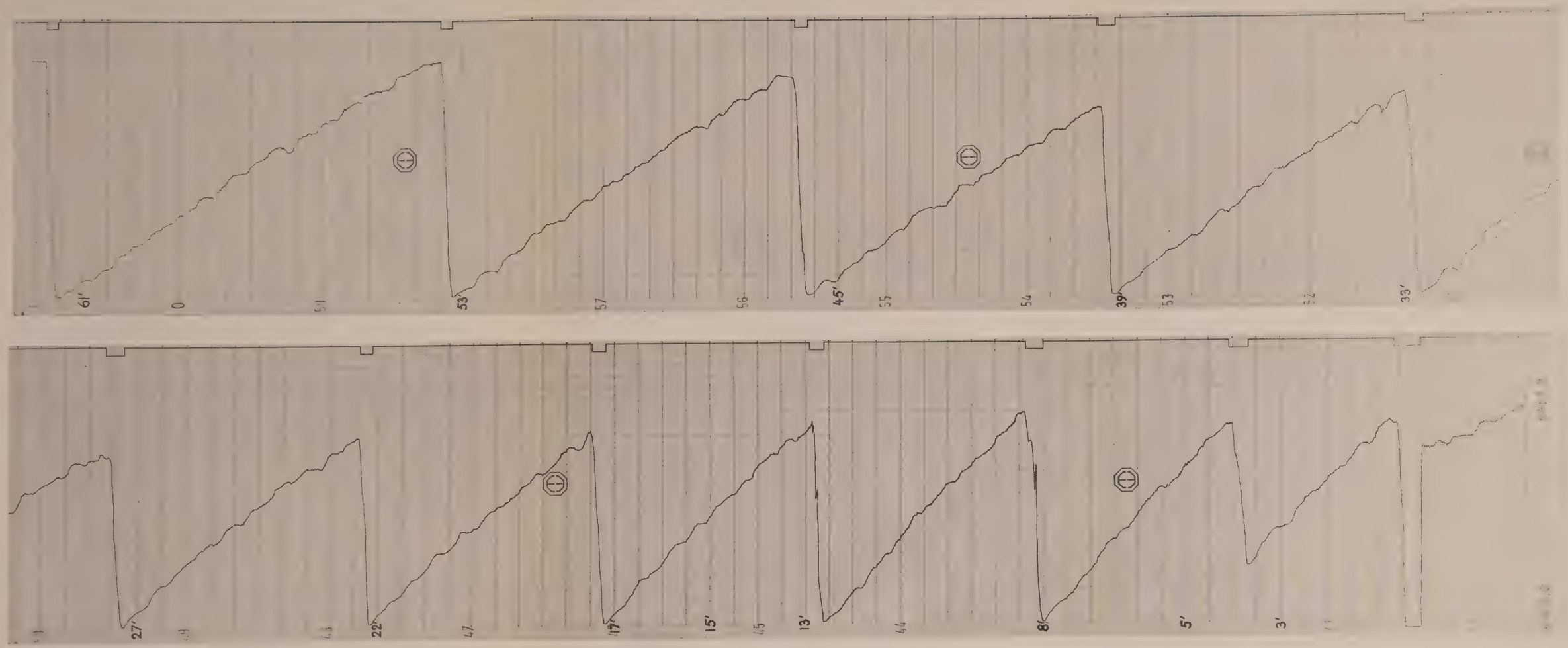

Fig. 6. — Activité lipolytique de la toxine staphylococcique n° 2185 sur l'huile d'olive.

tiquée dans les mêmes conditions, en introduisant dans le substrat réactionnel 2 cc de *la toxine staphylococcique* n° 2 185.

Nous avons contrôlé l'action lipolytique pendant une heure et dans la zone de pH allant de 8,0 à 8,2. Dans les tableaux suivants nous donnons les résultats de ces essais :

TABLEAU N° 9

Mycobacterium phleï

Temps en minutes	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
NaOH N/10 gouttes	6	10	14	17	19	26	29	32	34	36	40
Temps en minutes	36	39	42	45	48	51	54	57	60	63	66
NaOH N/10 gouttes	43	45	47	49	52	56	60	64	67	69	71

TABLEAU N° 10

Toxine staphylococcique 2185

Temps en minutes	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
NaOH N/10 gouttes.....	3	7	10	13	16	19	22	24	26	30
Temps en minutes	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60
NaOH N/10 gouttes	32	35	37	40	42	44	47	49	51	51

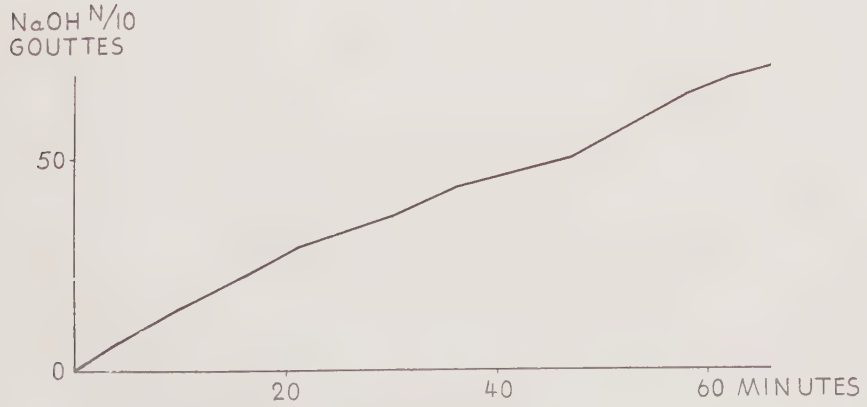

Fig. 7. — Activité lipolytique de la lipase mycobactérienne sur le jaune d'œuf.

Interprétation :

En examinant le pouvoir lipolytique de 40 mg de poudre de *Mycobacterium phleï* sur 0,4 g *de jaune d'œuf*, nous constatons que la consommation en NaOH N/10 correspond environ à 1/3 dans l'unité de temps par rapport à celle utilisée pour l'hydrolyse de *l'huile d'olive*. Toutefois, la dégradation *du jaune d'œuf par la lipase de Mycobacterium phleï* est nettement supérieure à celle provoquée par la lipase pancréatique.

La comparaison entre *le pouvoir lipolytique de la lipase bactérienne* et celui de *la toxine staphylococcique sur le jaune d'œuf* permet de constater que ce dernier est plus faible, ce qui prouve que *la toxine staphylococcique* contient un taux de *lipases* actives vis-à-vis des esters d'acides gras élevés beaucoup plus important que *de lécithinases*, comme il ressort de nos expériences précédentes. Toujours est-il que cette *toxine du Staphylocoque* n° 2 185 contient une forte proportion *d'enzymes lipolytiques*, contrairement aux autres toxines où nous n'avons pu constater aucune activité lipolytique.

CHAPITRE IV

CONTROLE DE L'ACTION DE DIFFÉRENTES LIPASES SUR DES TWEENS:

Nous nous sommes proposé d'examiner le pouvoir lipolytique des *lipases pancréatiques, fongiques et mycobactériennes sur différents Tweens.* Nous avons surtout employé *les Tweens* 20, 60 et 80.

Comme on le sait, *les Tweens sont des esters du Sorbitol combinés à différents acides gras.* dont *l'acide laurique* pour le Tween 20, *l'acide stéarique* pour le Tween 60 et *l'acide oléique* pour le Tween 80. La composition de ces différents corps peut donc être résumée de la façon suivante :

Tween 20 : poly-oxy-éthylène-sorbitol-mono-lauréate;
Tween 60 : poly-oxy-éthylène-sorbitol-mono-stéarate;
Tween 80 : poly-oxy-éthylène-sorbitol-mono-oléate.

A la température du laboratoire, *le Tween* 20 et *le Tween* 80 sont liquides, alors que *le Tween* 60 présente une consistance rappelant celle du miel.

Pour nos réactions, nous avons préparé les émulsions suivantes :

1) *Émulsion du Tween* 20 :

Mucilage de gomme arabique	165 cc
Glace pilée	15 g
Tween 20	20 cc.

2) *Émulsion de Tween* 60 :

Mucilage de gomme arabique	165 cc
Glace pilée	15 g
Tween 60	20 cc.

3) *Émulsion de Tween* 80 :

Mucilage de gomme arabique	165 cc
Glace pilée	15 g
Tween 80	20 cc.

Ces émulsions sont préparées dans le « mixer » refroidi et conservées à la glacière. Nous avons réalisé de la même façon des suspensions enzymatiques en incorporant respectivement 1 g de *lipase pancréatique, fongique ou mycobactérienne* dans chaque fois 82 cc de mucilage de gomme arabique et 17 g de glace concassée. Ces suspensions sont également obtenues dans le « mixer » refroidi. Pour chacune des expériences qui suivent, nous avons employé 10 cc de la suspension enzymatique correspondant à 100 mg de produit initial.

Le substrat réactionnel est constitué comme suit :

Émulsion du Tween en expérience	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	1 cc
Suspension enzymatique	10 cc.

Toutes les expériences sont effectuées à des pH allant de 8,0 à 8,2 et à une température de 40°. Nous donnons ci-dessous les résultats obtenus :

TABLEAU N° 11

Lipase	Nombre de gouttes de NaOH N/10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
	TWEEN 20									
pancréatique	65	102	131	160	184	203	222	242	258	272
fongique	99	18	18	—	—	—	—	—	—	—
mycobactérienne	24	40	56	72	88	102	118	133	145	158
	TWEEN 60									
pancréatique	30	53	70	83	96	106	117	124	133	142
fongique	10	16	20	23	27	29	29	29	29	29
mycobactérienne	17	26	34	43	52	60	68	75	82	88
	TWEEN 80									
pancréatique	36	60	78	97	113	128	243	158	169	178
fongique	10	18	22	26	29	33	34	34	35	36
mycobactérienne	23	36	47	56	63	70	77	84	91	99

Interprétation :

En considérant ces résultats, on note que *la lipase pancréatique* dégrade le plus rapidement *le Tween* 20 *(monolauréate)* et le plus lentement *le Tween* 60 *(monostéarate) ;* son action sur *le Tween* 80 *(mono-oléate)* n'est guère plus prononcée que sur *le Tween* 60.

L'activité hydrolytique de *la lipase fongique* est très peu prononcée vis-à-vis des trois réactifs mis en expérience. L'hydrolyse *du Tween* 20, sur lequel *la lipase pancréatique* a l'action la plus intense, est déjà interrompue après 6 minutes en présence de *la lipase fongique*. Son activité est sensiblement identique pour *les Tweens* 60 et 80 et médiocre dans les deux cas.

En ce qui concerne *la lipase mycobactérienne*, son pouvoir lipolytique s'exerce dans le même ordre que celui de *la lipase pancréatique*.

On note que *le pouvoir enzymatique de cette lipase mycobactérienne sur les esters du Sorbitol* est remarquablement prononcée, puisque dans ces expériences, nous avons mis en comparaison 100 mg *de lipase pancréatique avec* 100 mg *de lipase mycobactérienne*, tandis que lors des expériences précédentes au moyen *d'huile d'olive, de lécithine et de jaune d'œuf*, nous avons toujours mis en rapport l'activité de 10 mg *de lipase pancréatique* avec 100 mg *de lipase mycobactérienne*. Cette dernière hydrolyse aussi le plus rapidement *le Tween* 20, puis *le Tween* 80 *et le plus lentement le Tween* 60. Cependant, la dégradation de l'ester du *mono-oléate* n'est pas beaucoup plus rapide que celle de l'ester du *monostéarate*.

Nous pouvons donc conclure que l'activité lipolytique des *deux enzymes pancréatique et mycobactérienne* vis-à-vis *des Tweens* est sensiblement identique, alors que *la lipase de Candida lipolytica* dégrade en premier lieu *le Tween* 80, puis *le Tween* 60 et finalement *le Tween* 20. *Il y a donc une nette différence entre les enzymes lipolytiques de diverses origines*, ce qui ressort du graphique que nous donnons ci-joint :

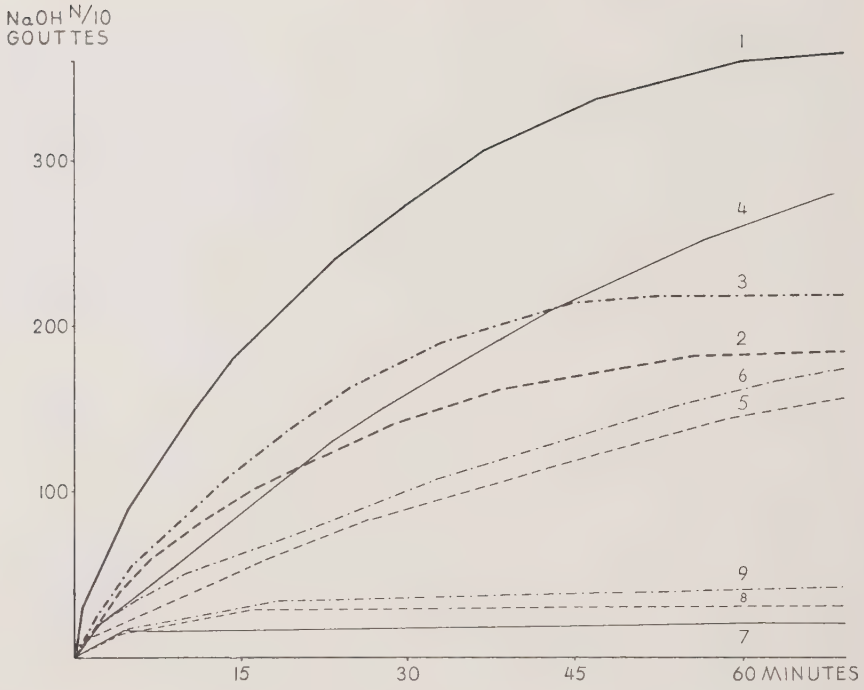

Fig. 8. — Activité lipolytique de :

1° 100 mg de lipase pancréatique sur le Tween 20;
2° 100 mg de lipase pancréatique sur le Tween 60;
3° 100 mg de lipase pancréatique sur le Tween 80;
4° 100 mg de lipase mycobactérienne sur le Tween 20;
5° 100 mg de lipase mycobactérienne sur le Tween 60;
5° 100 mg de lipase mycobactérienne sur le Tween 80;
7° 100 mg de lipase fongique sur le Tween 20;
8° 100 mg de lipase fongique sur le Tween 60;
9° 100 mg de lipase fongique sur le Tween 80.

Comme on le voit, ces courbes évoluent toutes *en hyperbole caractéristique des lipases proprement dites.*

CHAPITRE V

PURIFICATION DE LA LIPASE MYCOBACTÉRIENNE ET CONTROLE DE SON ACTION SUR DES LIPIDES SPÉCIFIQUES

Pour procéder à la purification, nous avons eu recours *à la méthode* de CALMETTE (11) qui emploie une série d'épuisements successifs à l'*alcool absolu, à l'éther de pétrole et au toluène* pour débarrasser *les bactéries acido-alcoolo-résistantes de* leur gaine ciro-graisseuse. Les germes ainsi privés de leur membrane lipidique ont été examinés quant à leur activité lipolytique. Nous avons pensé qu'à la suite de ce traitement nous pourrions libérer éventuellement des endo-enzymes n'ayant pu diffuser tant qu'elles étaient retenues par la membrane lipidique.

Mode opératoire:

Nous avons filtré nos cultures *de Mycobacterium phleï*, et le résidu bactérien a été lavé et séché. La masse bactérienne ainsi obtenue a été rapidement triturée dans un mortier d'agathe et la poudre est mise à macérer dans l'*alcool absolu* pendant 24 heure. L'alcool est séparé de la masse bactérienne par centrifugation et décanté; nous l'avons conservé pour étudier plus tard les substances lipidiques entrées en solution.

La masse bactérienne est ensuite traitée pendant 48 heures à l'*éther de pétrole ;* celui-ci est également séparé par centrifugation et conservé pour analyse.

Le résidu microbien est finalement mis en macération dans *le toluène* pendant sept jours. Le solvant est éliminé comme précédemment et conservé pour la recherche des produits lipidiques.

Le résidu bactérien est ensuite séché dans le vide. Pour nos analyses, nous avons chaque fois employé 2 g de poudre de *Mycabacterium phleï* qui ont été traités respectivement au moyen de 100 cc *d'alcool absolu*, de 50 cc *d'éther de pétrole* et de 50 cc de *toluène.*

Les fractions alcooliques et éthérées ont donné, après évaporation au moyen d'un courant d'air à la température du laboratoire, un résidu d'aspect gras. La fraction de toluène, traitée de la même façon, n'a laissé aucun résidu.

Dosage comparatif des lipases naturelles ou purifiées:

Nous avons effectué deux séries d'expériences en employant la poudre *de Mycobacterium phleï non traitée* et la même quantité *de poudre bactérienne délipoïdée d'après* CALMETTE. Le pouvoir lipolytique des deux échantillons a été contrôlé au moyen *du Tween* 20. Les deux échantillons ont été préparés au moyen de 100 mg de poudre bactérienne mise en suspension dans 10 cc de mucilage de gomme arabique. Le substrat réactionnel avait la composition suivante :

Émulsion de Tween 20 (à 10 %)	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	1 cc
Suspension enzymatique	10 cc.

Les expériences sont effectuées dans la zone de pH comprise entre 8,0 et 8,2, à la température de 40°. Nous donnons les résultats dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 12

Lipase mycobactérienne	Gouttes NaOH N/10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
délipoïdée	30	41	52	61	69	79	87	95	103	113
naturelle	32	47	58	68	77	85	95	104	112	121

Interprétation :

En considérant ces résultats, on note que *la technique de purification de* CALMETTE *par épuisement à l'alcool absolu, à l'éther de pétrole et au toluène* n'a pas stimulé l'activité lipolytique de nos poudres *de Mycobacterium phleï* débarrassées de leur gaine ciro-graisseuse, au contraire on note une légère diminution du pouvoir lipolytique.

La délipoïdation de nos cultures de Mycobacterium phleï n'avait pas seulement pour but d'augmenter éventuellement *le pouvoir lipolytique des bactéries*, mais encore nous avons pensé pouvoir éventuellement rendre solubles *les lipases* dans divers solvants : *eau, glycérine et huile d'olive*. Mais les résultats de ces essais ont toujours été négatifs.

Essai de l'activité lipasique sur les lipides isolés de Mycobacterium phleï:

Nous venons de décrire *la méthode de purification de* CALMETTE qui nous a permis d'isoler *deux résidus lipidiques*, l'un par extraction à

l'éther de pétrole, l'autre par extraction *à l'alcool absolu*. Ces deux graisses ont été mises en émulsion au moyen de notre mucilage de gomme arabique et nous les avons employées pour examiner leur hydrolyse par nos préparations enzymatiques et lipasiques :

1) 10 cc d'une suspension de 50 mg de lipase pancréatique;
2) 10 cc d'une suspension de 50 mg de poudre de Mycobacterium phleï purifiée d'après la méthode de CALMETTE.
3) 10 cc d'une suspension de 50 mg de poudre de Mycobacterium phleï non purifiée.

Nous donnons dans le tableau suivant les résultats de cette expérience.

TABLEAU N° 13

Lipase	Nombre de gouttes NaOH N/10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
	EXTRACTION A L'ÉTHER DE PÉTROLE									
pancréatique	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
mycobactérienne « Calmette » .	24	34	34	34	34	34	34	34	34	34
mycobactérienne « naturelle » .	24	31	37	42	46	50	53	56	60	62
	EXTRACTION A L'ALCOOL ABSOLU									
pancréatique	23	37	49	59	69	78	86	93	100	106
mycobactérienne « Calmette ».	7	12	16	20	23	26	29	32	34	35
mycobactérienne « naturelle ».	14	20	24	28	32	37	40	43	46	48

Interprétation :

En considérant ces résultats, on constate que *le résidu alcoolique obtenu* après évaporation du solvant est hydrolysé le plus rapidement et le plus intensément par *la lipase pancréatique*. La dégradation par la poudre *de Mycobacterium phleï* non traitée s'évalue à peu près à 50 % de celle de *la lipase pancréatique*.

La poudre bactérienne purifiée d'après la méthode de CALMETTE montre l'action lipolytique la moins intense *sur les lipides* extraits par l'Alcool.

En ce qui concerne *la dégradation des graisses extraites par l'éther de pétrole*, elle est sensiblement identique dans les 30 minutes de l'expérience à celle de *la lipase pancréatique* et de la lipase *de Mycobacterium phleï non traitée*. Dans le même laps de temps, la poudre bactérienne

purifiée d'après CALMETTE ne nécessite qu'environ 50 % de la dose de NaOH N/10 pour neutraliser les acides gras mis en liberté.

On voit ainsi que *les graisses synthétisées par Mycobacterium phleï* même sont les moins attaquées par *la lipase mycobactérienne purifiée.*

Essai d'accélération de l'hydrolyse des lipides idiogènes par addition de Glycérine:

En nous basant sur le fait que *la synthèse des lipides par Mycobacterium phleï* s'effectue électivement par addition de Glycérine au milieu nutritif, à raison de 6 % ou de 12 %, nous avons voulu contrôler si une telle addition au substrat réactionnel exerçait une influence activante sur *la dégradation de ces graisses.*

Nous avons donc effectué trois séries d'expériences, dont l'une servant de témoin était identique à la précédente; la seconde comportait un substrat réactionnel contenant 6 % de Glycérine et la troisième était effectuée en présence de 12 % de Glycérine.

Les résultats de ces trois essais nous ont permis de conclure que l'addition de Glycérine à 6 % ou 12 % au substrat réactionnel n'a aucune influence sur l'activité lipolytique.

CHAPITRE VI

RECHERCHE D'ANTILIPASES DANS LE SÉRUM DE LAPIN

Le taux des lipides de *Mycobacterium phleï* se chiffre à environ 40 % de leur poids sec et il va de soi que la synthèse de ces lipides nécessite la présence *de lipases chez des Mycobactéries.*

On sait que les lipides sont en relation étroite avec un certain nombre de propriétés biologiques de ces *Mycobactéries.* Nous ne mentionnons que les phénomènes d'allergie, la production d'anticorps spécifiques, la virulence de ces germes [Boquet et Nègre (12) Asselineau (13) Bloch (14)]. Par conséquent, il nous a semblé d'un grand intérêt de pouvoir éventuellement influencer ou orienter *la synthèse de ces lipides par la production d'Antilipases* dans le sang des sujets infectés.

Nous avons effectué une série d'expériences en injectant par voie sous-cutanée *les extraits lipasiques de Mycobacterium phleï et de Candida lipolytica* à des lapins pour contrôler la formation d'Antilipases dans leur sérum.

Mode opératoire:

Nous avons traité deux lapins par des injections intramusculaires de lipases *de Mycobacterium phleï* et deux autres par des injections de *lipases fongiques.*

Ces animaux ont reçu quatre injections successives :

Premier jour : 10 mg de lipase dans 1 cc de soluté physiologique;
quatrième jour : 15 mg de lipase dans 1,5 cc de soluté physiologique;
huitième jour : 15 mg de lipase dans 1,5 cc de soluté physiologique;
douzième jour : 20 mg de lipase dans 2,0 cc de soluté physiologique.

Pour éviter des infections secondaires, nous avons ajouté aux suspensions lipasiques 100 mg/cc de *Streptomycine Spécia.*

Ce traitement a été très bien supporté par les animaux et nous n'avons pu constater qu'après la 3e ou même la 4e injection la formation d'un petit nodule dur, non infecté, sans inflammation, qui s'est résorbé par la suite.

Dix jours après la dernière injection, nous avons prélevé le sang par ponction de la veine marginale de l'oreille. Le sang est conservé pendant

une heure à la température du laboratoire, puis 12 heures à la glacière. Après centrifugation, nous avons décanté le sérum surnageant que nous avons utilisé pour le contrôle d'une action frénatrice éventuelle sur nos lipases.

A ce sujet, nous avons procédé aux expériences suivantes :

La première série d'expériences, servant de témoin, était effectuée au moyen de 10 cc d'un substrat réactionnel contenant soit 10 % *d'huile d'olive*, soit 1 % *de lécithine.*

La suspension enzymatique contenait 50 mg de *poudre lipasique de Candida lipolytica* ou 50 mg de *poudre de Mycobacterium phleï* en suspension dans 5 cc de mucilage de gomme arabique.

La deuxième série d'expériences était effectuée avec le même substrat réactionnel, mais la suspension enzymatique (50 mg/5 cc) était additionnée de 0,5 cc de *sérum du lapin vacciné* avec les poudres lipasiques homologues. La suspension enzymatique additionnée de l'immunsérum correspondant a été soigneusement mélangée et disposée pendant une heure à l'étuve à 37°.

La troisième série d'expériences est effectuée toujours avec le même substrat réactionnel. La suspension enzymatique (50 mg/ 5 cc) est additionnée de 0,5 cc d'*immunsérum du lapin correspondant* puis chauffée pendant 30 minutes à 56° pour détruire le Complément idiogène. Après ce traitement le mélange est additionné de 10 gouttes de sérum de cobaye fournissant l'apport de Complément frais hétérologue. Ce mélange est ensuite disposé pendant une heure à 37°.

Expériences avec la lipase de Candida lipolytica:

Substrat réactionnel à base d'huile d'olive:

Nous avons employé 10 cc de l'émulsion de gomme arabique à l'huile d'olive et 50 mg de poudre lipasique de *Candida. Le premier essai* est effectué avec le substrat réactionnel suivant :

Émulsion de gomme arabique à 10% d'huile d'olive ...	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	6 cc
Suspension de lipase fongique	5 cc.

Le deuxième essai est pratiqué au moyen de l'émulsion d'huile d'olive en présence de la *lipase fongique* additionnée de 0,5 cc de *sérum frais.* Le substrat réactionnel était donc le suivant :

Émulsion de gomme arabique à 10 % d'huile d'olive ..	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	5,5 cc
Suspension lipasique + sérum	5,5 cc.

Le troisième essai est effectué dans les mêmes conditions, mais la suspension enzymatique est mise en présence de sérum inactivé et complétée avec du Complément de cobaye frais. Nous enregistrons les résultats de ces trois essais dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 14

Essai N°	Gouttes de NaOH N/10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1 (témoin)	34	69	100	130	160	185	218	250	277	300
2	21	40	61	71	84	100	114	127	141	151
3	10	19	26	32	38	44	49	55	61	67

En considérant ces résultats, on constate tout d'abord que la quantité de NaOH N 10 nécessaire pour neutraliser *les acides gras mis en liberté par la lipase fongique* à partir de l'huile d'olive se chiffre à 300 gouttes après 30 minutes, tandis que l'hydrolyse réalisée par la même quantité de *lipase fongique*, mais additionnée de 0,5 cc d'immunsérum ne demande que 151 gouttes de NaOH N/10, soit environ 50 %.

Dans le troisième essai, pratiqué après inactivation de l'*immunsérum* spécifique et addition de 10 gouttes de *sérum frais de cobaye*, les 50 mg de lipase fongique ont une activité lipolytique encore plus diminuée, puisqu'après 30 minutes d'expérience, la consommation en NaOH N/10 n'est que de 67 gouttes, ce qui correspond à 22 % de l'activité lipolytique initiale.

Substrat réactionnel à base de Lécithine :

Nous avons préparé le substrat réactionnel à base de Lécithine comme nous l'avons indiqué dans le Chapitre II et sa composition finale est la suivante :

Émulsion de lécithine (à 1 %).....	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	6 cc
Suspension enzymatique	5 cc.

Ce substrat témoin était modifié en y ajoutant 0,5 cc d'immunsérum au détriment de la dose d'eau bidistillée *dans le second essai ; dans le troisième essai* l'immunsérum était inactivé et complété par 10 gouttes de sérum frais de cobaye.

TABLEAU N° 15

Essai N°	Gouttes NaOH N/10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1 (témoin)	7	11	20	26	35	42	47	52	60	69
2	6	10	13	16	20	23	26	29	32	36
3	3	6	9	11	14	16	18	20	22	23

Comparativement avec l'expérience précédente, on constate que *la lipase fongique* est moins active vis-à-vis de la Lécithine que vis-à-vis de l'huile d'olive: cependant, comme nous l'avons déjà constaté antérieurement, il ressort de l'essai témoin que *Candida lipolytica* élabore également *une lécithinase.* D'autre part, l'injection de *la poudre lipasique fongique* a fait appaître dans les humeurs du lapin *une Antilipase* qui se manifeste lors de nos expériences avec l'immunsérum naturel par une diminution de 50 % environ de l'action hydrolytique.

Le troisième essai où le système lipase-antilipase est stabilisé par une inactivation préalable de l'immunsérum, montre une intensité de neutralisation de *la lécithinase* encore plus prononcée, confirmant ainsi les résultats que nous avons obtenus antérieurement avec l'huile d'olive.

Expériences au moyen de la lipase de Mycobacterium phleï:

Substrat réactionnel à base d'huile d'olive:

Cette expérience est effectuée avec 10 cc d'émulsion de gomme arabique à 10 °$_0$ d'huile d'olive et 50 mg de poudre de *Mycobacterium phleï.*

La composition des substrats réactionnels était toujours identique à celle des essais antérieurs. et nous avons de nouveau fait trois essais comme précédemment.

TABLEAU N° 16

Essai N°	Gouttes NaOH N/10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1 (témoin)	14	29	56	87	104	120	136	146	160	174
2.....	7	14	26	39	47	57	70	76	82	88
3.....	6	9	13	20	27	35	43	50	56	60

On voit que *la lipase de Mycobacterium phleï* est moins active sur l'huile d'olive que celle de *Candida lipolytica*. L'immunsérum de lapin contient également des Antilipases qui se montrent actives aussi bien dans le sérum à l'état natif que dans le sérum inactivé et additionné de Complément de cobaye. L'inactivation avait ici également provoqué une stabilisation des Antilipases, probablement par la disparition de facteurs inhibiteurs thermolabiles. Dans l'ensemble, cette expérience confirme nos constatations en ce qui concerne *la lipase de Candida lipolytica*.

Substrat réactionnel à base de Lécithine:

Nous avons encore employé un substrat réactionnel contenant 10 cc d'une suspension de Lécithine à 1 %. L'hydrolyse a été effectuée par 5 cc d'une suspension enzymatique correspondant à 50 mg de poudre *de Mycobacterium phleï*. L'expérience est effectuée selon le même protocole que précédemment.

TABLEAU N° 17

Essai N°	Gouttes NaOH N/10 — Temps en minutes									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1 (témoin)	35	50	61	69	76	83	89	94	99	104
2.....	15	21	27	34	39	44	50	55	58	62
3.....	12	18	25	31	36	41	48	53	56	59

Mycobacterium phleï élabore une lécithinase beaucoup plus active que la lipase proprement dite, c'est-à-dire que la dégradation de la Lécithine est plus importante que celle de l'huile d'olive.

D'autre part, par rapport aux expériences avec *la poudre de Candida lipolytica*, nous voyons que *la lécithinase de Mycobacterium phleï* est beaucoup plus active. Notre préparation lipasique de *Mycobacterium phleï est à prédominance lécithinolytique*.

Nous constatons ainsi dans l'essai témoin que le taux de NaOH N/10 nécessaire pour neutraliser les produits de clivage de la Lécithine mis en liberté par 50 mg de poudre *de Mycobacterium phleï* est de 104 gouttes après 30 minutes. Par contre, la même dose de poudre *de Mycobacterium phleï*, mise en contact avec 0,5 cc d'immunsérum spécifique contenant par conséquent des *Antilécithinases*, n'emploie que 62 gouttes de NaOH N/10. Le rendement de l'hydrolyse est donc diminué de 40 %. *L'inactivation de l'immunsérum* et l'addition de Complément frais de cobaye ne modifient guère le pouvoir lécithinolytique de la poudre *de Mycobacterium phleï*. L'action neutralisante de *l'Antilécithinase* se traduit par une perte de l'activité hydrolysante de 43 %.

Nous reproduisons ces résultats dans un graphique :

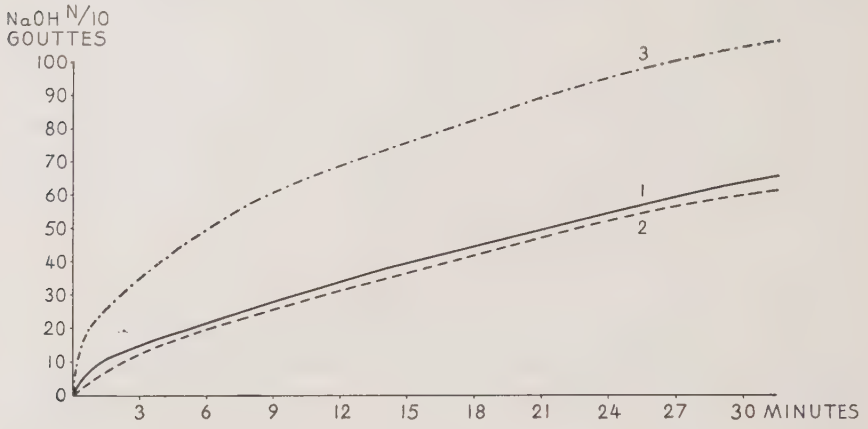

Fig. 9. — Activité lipolytique de :

1° Lipase mycobactérienne + sérum natif sur la lécithine;

2° Lipase mycobactérienne + sérum inactivé + complément de cobaye sur la lécithine;

3° Lipase mycobactérienne sur la lécithine.

Essai de l'influence du sérum de lapin non traité sur l'activité lipasique :

Il nous a semblé important d'étudier l'influence du *sérum de lapin normal* sur l'activité des lipases envisagées. Ayant constaté dans nos expériences précédentes *une neutralisation partielle de nos lipases et lécithinases* par l'addition de sérum d'animaux préalablement vaccinés, il fallait démontrer la spécificité de l'action des Antilipases, puisque cette inactivation aurait pu être imputable à des inhibiteurs introduits par les sérums. C'est pour cette raison que nous avons effectué cette nouvelle série d'expériences au moyen de *sérum d'animaux normaux.*

Nous avons fait trois essais parallèles :

1) Étude de l'hydrolyse de l'huile d'olive par 50 mg de poudre de *Candida lipolytica* additionnée de 2 cc de sérum de lapin normal.
2) Étude de l'hydrolyse de l'huile d'olive par 50 mg de poudre de *Candida lipolytica* sans addition de sérum.
3) Étude de l'hydrolyse de l'huile d'olive par 50 mg de poudre de *Candida lipolytica* avce addition de 2 cc de sérum de lapin vacciné.

Le protocole expérimental était encore le même que dans les essais précédents.

Comme le démontre le graphique ci-dessous, l'hydrolyse de l'huile d'olive :

1) par *la lipase fongique + sérum de lapin normal* a nécessité 194 gouttes de NaOH N /10;

2) par *la lipase fongique seule* nécessite 205 gouttes de NaOH N/10;
3) par *la lipase fongique + l'immunsérum* demande 110 gouttes de NaOH N/10.

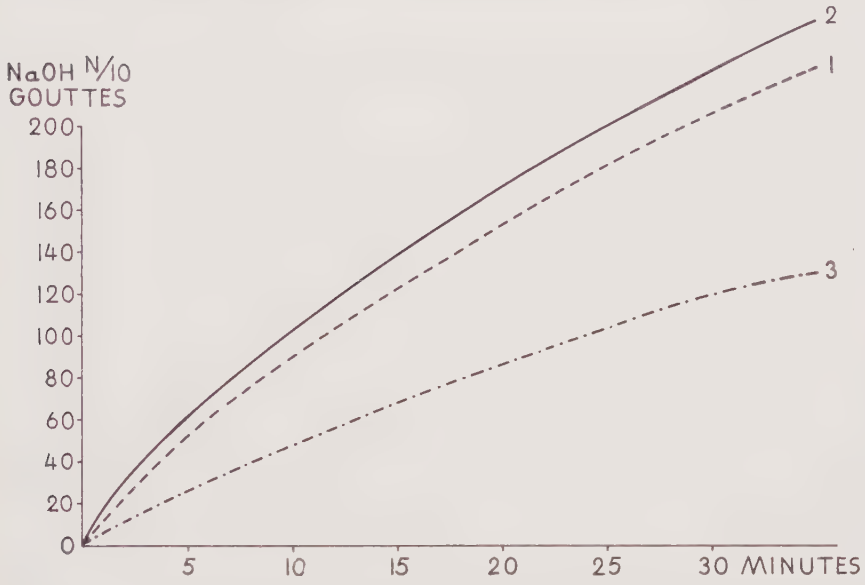

Fig. 10. — Courbes montrant l'influence des antilipases de l'immunsérum frais de lapin normal sur l'huile d'olive. Action de la lipase fongique sans addition de sérum.

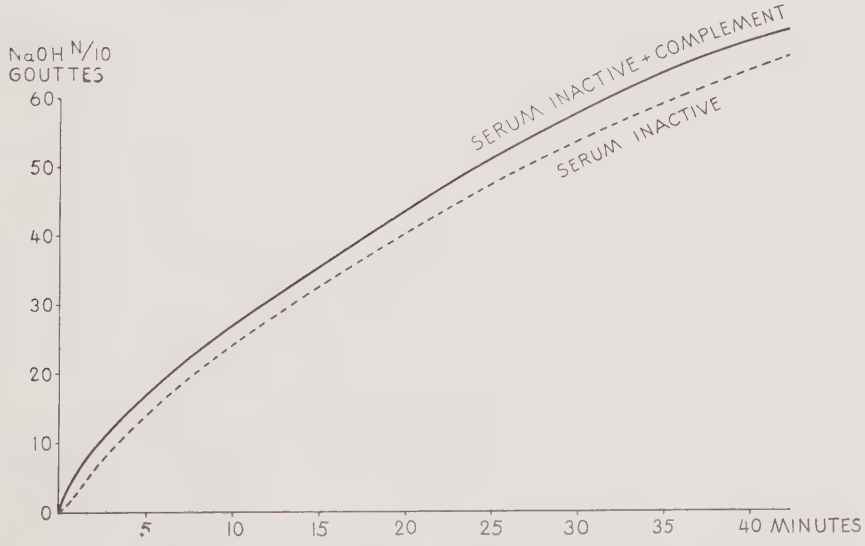

Fig. 11. — Courbes montrant l'influence des antilipases de l'immunsérum inactivé de lapin + complément frais de cobaye sur l'huile d'olive.

La comparaison des résultats des premier et deuxième essais montre que l'addition de *sérum normal de lapin* n'a pratiquement aucun effet inhibiteur sur l'activité hydrolytique de la lipase fongique vis-à-vis de l'huile d'olive. *Le troisième essai* est effectué avec *un immunsérum spécifique* et n'a qu'une valeur de témoin; il confirme le résultat enregistré précédemment. Tous ces essais ont été effectués dans des zones de pH de 8,0 à 8,2 et à une température de 40°.

Ces résultats démontrent l'absence de *facteurs inhibiteurs pour la lipase dans le sérum normal de lapin* et confirment les propriétés antigéniques « *in vivo* » de nos poudres lipasiques.

A ce sujet, il nous a semblé intéressant d'étudier s'il s'agit *d'une réaction antigène-anticorps* avec ou sans intervention du Complément.

Pour élucider le problème concernant *le rôle du Complément* dans cette réaction sérologique, nous avons pratiqué les expériences suivantes :

1) Hydrolyse de l'huile d'olive par 50 mg de poudre de *Candida lipolytica* en suspension dans le mucilage de gomme arabique additionné de 0,5 cc d'*immunsérum de lapin* (contenant par conséquent *des Antilipases*). Ce sérum est inactivé par un chauffage à 56° pendant 30 minutes et est de ce fait privé de Complément. Nous avons contrôlé l'effet frénateur de ce sérum inactivé sur l'activité lipolytique de la poudre de *Candida lipolytica*.
2) Le protocole expérimental du second essai est rigoureusement identique au premier, avec adjonction ultérieure de 10 gouttes de sérum frais de cobaye.

Les résultats de ces expériences sont illustrés dans le graphique N° 11, faisant suite aux Conclusions Générales.

Comme le prouvent ces courbes, la dégradation de l'huile d'olive par *la lipase fongique additionnée de sérum inactivé de lapin vacciné* nécessite 53 gouttes de NaOH N/10 en 30 minutes pour neutraliser les acides mis en liberté.

L'hydrolyse de l'huile d'olive par *la lipase fongique additionnée d'immunsérum inactivé et de Complément frais de cobaye* demande 58 gouttes de NaOH N/10 en 30 minutes.

En considérant ces deux résultats, on peut en déduire que *le Complément ne joue pratiquement aucun rôle* dans la neutralisation plus ou moins prononcée de l'activité lipasique, puisque l'expérience effectuée en l'absence de toute trace de Complément nous a donné un résultat sensiblement identique à celle pratiquée en présence de Complément d'activité connue.

Une intervention du Complément dans *le processus sérologique lipase-antilipase* ne peut pas être incriminée et nous avons donc à faire à des Anticorps *(Antilipases et Antilécithinases)* rentrant dans le groupe d'Ehrlich, agissant sur les produits d'excrétion ou de sécrétion microbiens sans intervention du Complément.

Les mêmes expériences au moyen de poudre *de Mycobacterium phleï* ont confirmé ces résultats.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Poursuivant les travaux sur *les zoolipases effectués dans le Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, nous nous sommes fixé pour but d'étudier *les lipases de Mycobacterium phleï, Mœller*. Ces enzymes ont déjà fait l'objet des recherches de Schær et Marti en 1953, qui ont pratiqué des *dosages titrimétriques ou stalagmométriques*.

Entre temps, les méthodes d'isolement de purification et de dosage ont été nettement améliorées, de sorte que de nouveaux problèmes se sont présentés à nous.

Pour mener à bien notre étude, nous avons été obligé d'effectuer des cultures de *Mycobacterium phleï* dans des conditions optimales pour l'élaboration des enzymes lipolytiques. A partir de ces cultures, nous avons préparé *une poudre lipasique déshydratée* que nous avons purifiée au moyen *d'Acétone et d'Ether*.

Nous décrivons ensuite la méthode de contrôle de l'activité de ces lipases: celle-ci nécessite l'emploi d'un appareillage dont nous donnons succinctement le montage, en renvoyant pour les détails à Christen. Les substrats réactionnels qui sont composés soit d'*huile d'olive soit d'autres produits lipidiques* sont mis en suspension dans une émulsion de gomme arabique d'après les indications de Desnuelle. *Les poudres lipasiques* sont également mises en suspension dans un mucilage de gomme et les modifications de la concentration ionique du substrat réactionnel sous l'action des lipases sont contrôlées au moyen d'un pH-mètre sous agitation continue.

Nous avons tout d'abord employé des cultures de *Mycobacterium phleï* âgées de six jours. On sépare le milieu liquide pour récolter la masse bactérienne qui est abondamment lavée à l'eau bidistillée, puis déshydratée avec les précautions nécessaires. Une partie de la poudre a été mise en macération dans l'huile d'olive et agitée mécaniquement pendant une heure, puis après centrifugation la phase huileuse est examinée quant à sa teneur *en lipase liposoluble*, avec un résultat négatif.

Les essais de solubilisation *des lipases mycobactériennes* dans la Glycérine ont été effectués de la même manière. La macération a été conservée pendant 12 heures à 37° après une heure d'agitation mécanique. *Nous n'avons pas pu déceler d'enzyme lipolytique soluble dans la Glycérine*.

La même technique a été employée pour mettre éventuellement les lipases en solution aqueuse. Ici, l'agitation mécanique a duré deux

heures suivie de 24 heures de macération à la glacière. *La phase aqueuse était également dépourvue d'activité lipolytique.*

Au cours de toutes ces recherches, nous avons fait des essais de contrôle sur *le résidu bactérien*, qui contenait toujours des lipases très actives sur l'huile d'olive.

A la suite de cet insuccès relatif à la solubilisation de nos lipases et pensant qu'il s'agit de *ferments endocellulaires, nous avons procédé à un broyage* très poussé de la masse bactérienne au moyen d'un broyeur électrique à galets de porcelaine, en présence de sable de quartz. La poudre très fine ainsi obtenue a été mise en macération dans l'eau et dans l'huile d'olive, mais les phases liquides étaient également dépourvues de lipases.

D'autre part, nous avons pu constater que *le résidu bactérien broyé* et épuisé par l'eau ou l'huile d'olive avait perdu une forte proportion de son pouvoir lipolytique, ce qui nous permet de conclure que *le broyage mécanique prolongé a détruit partiellement les lipases de Mycobacterium phleï.*

Nous avons ensuite pensé pouvoir libérer les lipases de leur support cytoplasmatique par une digestion préalable des masses bactériennes au moyen de *la Papaïne, enzyme protéolytique.* Cette technique n'a pas permis non plus d'obtenir une solubilisation des lipases dans l'eau ou dans l'huile et le traitement n'a amené aucune stimulation de l'activité lipolytique.

On pouvait supposer qu'il serait possible de libérer les lipases par modification du pH; à ce sujet, nous avons employé des *tampons citratés et boratés* faisant varier la concentration ionique de pH = 6,0 à 11,0. Ces essais ne nous ont pas permis d'isoler de *lipases hydrosolubles* et l'activité enzymatique des *masses bactériennes résiduelles* est restée intégrale.

Les résultats ont été identiques dans les essais de libération *des lipases phléiques* par traitement aux solutions normales de HCl et de NaOH à la température de 50°.

Nous avons ensuite orienté nos investigations vers une étude comparative de *notre lipase mycobactérienne avec d'autres lipases déjà connues : la lipase pancréatique et celle de Candida lipolytica.* Ces trois enzymes ont été examinées quant à la rapidité et à l'intensité avec lesquelles elles dégradent *des esters à poids moléculaire élevé (huile d'olive) et des phospholipides (Lipostabil).*

Nous avons ainsi pu constater que *l'activité lipasique vis-à-vis de l'huile d'olive* s'inscrit dans l'ordre décroissant suivant :

1) lipase pancréatique
2) lipase fongique
3) lipase mycobactérienne.

Il en est différemment pour le *substrat réactionnel phospholipidique*, où l'ordre décroissant était :

1) lipase mycobactérienne
2) lipase pancréatique
3) lipase fongique.

Les trois enzymes ont ensuite été examinées quant à leur action hydrolytique vis-à-vis de *deux phosphoaminolipides et d'un phospholipide*. Le *phosphoaminolipide de soja* a été activement hydrolysé par *la lipase pancréatique et la lipase fongique* et d'une façon moins satisfaisante par la *lipase mycobactérienne*.

Le *colamine-inositophosphoaminolipide* était rapidement dégradé par la *lipase phléique* et très lentement par les deux autres enzymes.

Le *choline-phospholipide* a été relativement vite hydrolysé par les trois enzymes et particulièrement par la *lipase mycobactérienne*.

Nous avons ensuite étudié l'action lipolytique de nos trois enzymes sur un phosphoaminolipide, la *Lécithine*, que la *lipase pancréatique* a médiocrement attaquée : la *lipase fongique* ne dégrade pas plus rapidement la Lécithine que la lipase pancréatique, mais son activité est plus durable et se prolonge au-delà d'une heure. La *lipase mycobactérienne* dégrade la Lécithine d'une façon très rapide et très intense et doit par conséquent renfermer *un taux de lécithinase* beaucoup plus important que les deux autres complexes lipasiques.

Continuant ces recherches, nous avons étudié la *lipase pancréatique et la lipase mycobactérienne* comparativement sur la *lécithine et le jaune d'œuf*. De ces essais, nous pouvons conclure que la *lipase pancréatique* contient, en plus de la *lécithinase*, d'autres enzymes lipolytiques intervenant dans l'hydrolyse du jaune d'œuf, contrairement à la *lipase mycobactérienne* où l'hydrolyse du *jaune d'œuf* a nécessité 67 gouttes de NaOH N 10 en 60 minutes, alors que l'hydrolyse de la *Lécithine* demandait dans le même temps 205 gouttes de NaOH N/10.

Les mêmes expériences ont été répétées en faisant varier la *concentration ionique* du substrat réactionnel qui, de 8,0 - 8,2 a été porté à pH = 7,0 - 7,2. Nous avons éprouvé nos trois lipases et constaté qu'en travaillant en zone neutre l'activité est nettement diminuée; ainsi, le rendement n'était que de 35 % pour *la lipase pancréatique*, de 40 % pour *la lipase mycobactérienne* et *la lipase fongique* est absolument inactive dans ces conditions.

Ayant à notre disposition des *toxines staphylococciques* qui, d'après Richou et ses collaborateurs, devaient posséder une *certaine activité lipolytique*, nous avons contrôlé celle-ci sur le jaune d'œuf. Nous avons profité de nos constatations antérieures au moyen de la *lipase pancréatique* pour réaliser nos essais dans les conditions les plus favorables. Nous avions en effet remarqué que *des doses trop fortes de jaune d'œuf agissaient comme des réactifs tampon très actifs*, de sorte que nous avons eu

recours à une émulsion de jaune d'œuf à 0,4 %, c'est-à-dire 10 fois plus faible que la dose préconisée par la méthode Richou.

Nous n'avons pas pu déceler de *pouvoir lipolytique ou estérasique* dans la *toxine staphylococcique des souches Wood*, et une action lipasique certaine des *toxines n°* 2 013 *de St. Bouley* et *n°* 2 069 *de St. Hautefort.* Les deux toxines étaient également dépourvues d'estérase. Par contre, la *toxine du Staphylocoque n°* 2 185 dégradait l'huile d'olive avec une rapidité et une intensité correspondant sensiblement à celles de 100 mg de notre *poudre lipasique de Mycobacterium phleï.*

A titre comparatif, nous avons examiné *la lipase mycobactérienne* (40 mg) sur 0,4 g de jaune d'œuf et avons constaté que la consommation en NaOH N/10 correspond environ à 33 % dans l'unité de temps, par rapport à celle utilisée pour hydrolyser l'huile d'olive. Toutefois *cette dégradation du jaune d'œuf par la lipase phléique est nettement supérieure à celle de la lipase pancréatique.*

La comparaison entre le pouvoir lipolytique de *la lipase mycobactérienne et celui de la toxine staphylococcique sur le jaune d'œuf* permet de constater que ce dernier est plus faible, ce qui prouve que *la toxine staphylococcique contient un taux de lipase active sur les esters d'acides gras élevés beaucoup plus important que de lécithinase*, comme cela ressort de nos expériences précédentes.

Nous avons ensuite examiné le pouvoir lipasique de nos trois enzymes *(Pancréas, Candida et Mycobacterium)* sur 10 cc d'une émulsion à 10 % *de Tween* 20, 60 et 80 dans le mucilage de gomme arabique. Toutes ces expériences ont été effectuées dans la zone de pH de 8,0 à 8,2 et à la température de 40°. Nous avons constaté que *la lipase pancréatique hydrolyse le plus rapidement l'ester de l'acide laurique (Tween* 20*)*, puis celui de *l'acide oléique (Tween* 80*)* et le plus faiblement celui de *l'Acide stéarique (Tween* 60*).*

La lipase mycobactérienne a dégradé *les trois Tweens* dans le même ordre décroissant, mais avec une activité lipolytique légèrement plus faible. Il faut cependant remarquer que nous avons employé dans ces expériences les mêmes doses de poudre pancréatique et de poudre mycobactérienne, alors qu'auparavant le rapport lipase pancréatique/lipase mycobactérienne était de 1/10. On peut ainsi conclure que l'activité lipolytique *de la lipase phléique vis-à-vis des Tweens* est excessivement forte.

La lipase fongique dégrade les trois Tweens beaucoup plus lentement et dans l'ordre décroissant suivant : Tween 80, Tween 60, puis finalement Tween 20.

Nous avons ensuite tenté de purifier *notre lipase mycobactérienne par le procédé* de Calmette ayant recours à un épuisement par *l'alcool absolu, l'éther et le toluène.* Le contrôle de l'activité lipasique de la poudre ainsi purifiée était effectué sur le Tween 20 et a permis de constater une légère diminution de l'activité lipolytique. *Les poudres mycobactériennes*

ainsi épuisées ne nous ont pas permis non plus de libérer les lipases par solubilisation dans l'*eau, la glycérine et l'huile d'olive.*

Par cette technique d'épuisement, nous avons pu isoler *deux résidus lipidiques*, l'un par extraction à *l'éther de pétrole*, l'autre par extraction à *l'alcool absolu*. Les graisses de *l'épuisement alcoolique* ont été le plus rapidement hydrolysées par *les lipases pancréatiques ;* par rapport à cette dégradation, *la lipase de Mycobacterium phleï* non traitée donnait un rendement d'environ 50 % alors que la lipase purifiée est encore moins active.

Quant à la fraction éthérée, le pouvoir lipolytique était sensiblement identique pour *la lipase pancréatique et la lipase mycobactérienne non traitée*, tandis que *la lipase purifiée* donnait un rendement de 50 % seulement. On constate donc que l'hydrolyse des produits lipidiques synthétisés par les bactéries est peu prononcée pour *les lipases idiogènes.*

Nous avons ensuite examiné l'influence de la glycérine ajoutée au substrat réactionnel à base de graisse idiogène et on a pu constater que la lipase mycobactérienne ne subissait de ce fait aucune action stimulante ni frénatrice.

Finalement, nous avons jugé intéressant d'étudier le pouvoir antigénique de nos lipases « in vivo ». Des lapins ont été vaccinés avec des doses progressivement croissantes de lipase fongique d'une part et de lipase phléique d'autre part. Nous avons ainsi pu constater la formation d'antilipases dans ces immunsérums de lapin. 0,5 cc d'immunsérum diminue l'activité de 50 mg de lipase fongique et mycobactérienne vis-à-vis de l'huile d'olive dans les proportions de 50 %. L'inactivation par chauffage à 56° de l'immunsérum et l'addition ultérieure de complément de cobaye ont occasionné une diminution encore plus forte de l'activité de nos lipases, qui est tombée à 20 — 22 % de l'activité initiale.

La production d'anticorps par la vaccination se manifeste également vis-à-vis de la lécithine employée comme substrat réactionnel; les antilécithinases du sérum natif ainsi formées rabaissent l'activité lipasique de Mycobacterium phleï à 60 % et celle de Candida lipolytica à 50 %. Avec l'immunsérum inactivé additionné de complément frais de cobaye, le résultat est ici sensiblement identique à celui obtenu en présence de l'immunsérum natif. Une intervention du complément dans le processus sérologique lipase-antilipase ou lécithinase-antilécithinase n'a pu être décelée et nous avons conclu que nous avons affaire à des anticorps entrant dans le groupe d'Ehrlich agissant sur les antigènes d'excrétion ou de sécrétion microbiens sans intervention du complément.

Au cours de nos travaux, nous avons pu constater qu'il y avait une nette différence entre les diverses lipases que nous avons examinées : *pancréatiques, fongiques et mycobactériennes.* Nous avons relevé des caractères d'identité nettement spécifiques pour ces différentes enzymes,

à savoir leur action sur *les esters supérieurs* (huile d'olive, etc.), *sur les phospholipides*, *les phosphoaminolipides et sur les Tweens*.

Nous avons ainsi donné *les moyens de diagnostic différentiel* pour ces diverses enzymes lipolytiques devant, d'après nos résultats, toujours former *un complexe* qui, dans le cas de *la lipase mycobactérienne* est constitué en majeure partie *de lécithinase*, mais contient en plus des lipases proprement dites, comme nous avons pu le démontrer par l'emploi des différents Tweens.

Nous avons d'autre part constaté que *la différenciation de ces diverses enzymes lipolytiques peut se faire par réaction sérologique*, étant donné leur caractère antigénique spécifique « in vivo ».

BIBLIOGRAPHIE

(8) Ammon et Dirscherl. — *Fermente, Hormone, Vitamine*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1959.

(6) Arnold E. — *Étude différentielle de deux lipases fongiques. Essai d'isolement, de caractérisation et de purification de ces enzymes.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1960/61.

(13) Asselineau. — Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 1397.

(14) Bloch B. — Amer. Rev. Tub., 1950, 61, 270.

(12) Boquet A. et Nègre J, — Ann. Inst. Pasteur, 1923, 37, 787.

(11) Calmette, Guérin et Breton. — Ann. Inst. Pasteur, 1907, t. 21, n° 6.

(5) Christen H. U. — *Étude différentielle des estérases, des lipases liposolubles et des lipases hydrosolubles.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1959.

(3) Desnuelle, Constantin et Baldy. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 285.

(7) Kordatzki. — *Taschenbuch der praktischen pH-Messungen*, Muller et Steinicke Verlag, Munich, 1938.

(2) Marti E. F. — *Les ferments lipolytiques des Mycobactéries. Essais d'isolement et de purification des lipases bactériennes.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1953.

(1) Meyer J. — *Les ferments lipolytiques du sérum sanguin et des bactéries acido-alcoolo-résistantes. Leur rôle dans le processus physio-pathologique.* Thèse Doct. Pharm. (État), Strasbourg, 1947.

(10) Richou R., Mme Richou, Quinchon et Pantaléon. — Rev. Immun, 1960, 24, 496.

(9) Richou R. — C. R. Ac. Sc., 1959, 249, 2131.

(4) Willstaetter et Memmen. — *Hoppe Seyler's Zeit. physiol. Chem.*, 1923, 129, 1; 1924, 133, 229; 1924, 138, 216.

Vu, Strasbourg, le 19 décembre 1960

Le Président du Jury,

R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 3 janvier 1961

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

P. DUQUÉNOIS

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 5 janvier 1961

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université,

J. F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 7

CHAPITRE I

Culture de mycobacterium phleï et isolement de sa lipase 9

Préparation de notre poudre lipasique déshydratée 10
Essai de purification au moyen d'acétone et d'éther 10
Méthode de dosage de l'activité lipolytique 11
Expériences au moyen de la lipase de Mycobacterium phleï 12

CHAPITRE II

Essai sur la dégradation lipasique de différents phospholipides 19

Essai sur la dégradation de deux phosphatides et d'un phospholipide ... 23
Essai de dégradation lipasique d'un phospholipide essentiel, la lécithine .. 26
Essai différentiel de l'action de nos lipases sur le jaune d'œuf et la lécithine 27
Essai de l'activité enzymatique sur la lécithine entre pH = 7,0 et 7,2 29

CHAPITRE III

Essai du pouvoir lipolytique de différentes toxines staphylococciques vis-à-vis du jaune d'œuf 31

Action lipolytique de notre poudre de Mycobacterium phleï et de la toxine staphylococcique 2185 sur le jaune d'œuf 34

CHAPITRE IV

Contrôle de l'action de différentes lipases sur des Tweens 37

CHAPITRE V

Purification de la lipase mycobactérienne et contrôle de son action sur des lipides spécifiques 41

Mode opératoire 41
Dosage comparatif des lipases naturelles ou dégraissées 42
Essai de l'activité lipasique sur les lipides isolés de Mycobacterium phleï.. 42
Essai d'accélération de l'hydrolyse des lipides idiogènes par addition de glycérine 44

CHAPITRE VI

Recherche d'antilipases dans le sérum de lapin 45

Expériences avec la lipase de Candida lipolytica 46
Expériences au moyen de la lipase de Mycobacterium phleï 48
Essai de l'influence du sérum de lapin non traité sur l'activité lipasique... 50

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 53

BIBLIOGRAPHIE 59

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES
DE STRASBOURG

★

Dépôt légal N° 6137/60